

# **Diarylether und Diarylthioether als antiplasmodiale Wirkstoffe**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Thomas Weidner  
aus Coburg

1. Referent: Prof. Dr. Conrad Kunick  
2. Referent: Prof. Dr. Knut Baumann  
eingereicht am: 07.11.2016  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.02.2017

Druckjahr 2017

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Weidner, T.; Nasereddin, A.; Preu, L.; Grünefeld, J.; Dzikowski, R.; Kunick, C., Novel 2-phenoxyanilide congeners derived from a hit structure of the TCAMS: Synthesis and evaluation of their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*. *Molecules* **2016**, *21*, 223.

## **Tagungsbeiträge**

Weidner, T.; Nasereddin, A.; Dzikowski, R.; Preu, L.; Grünefeld, J.; Kunick, C., Synthesis, Chemical and Biological Characterization of a Compound Series Derived from a Hit Structure of the Tres Cantos Antimalarial Compound Set. (Poster) 4th conference on protein kinases of parasitic protozoa: targeting signaling pathways in parasites, Haifa, 2015.

Weidner, T.; Nasereddin, A.; Preu, L.; Grünefeld, J.; Dzikowski, R.; Kunick, C., Development and characterization of a compound series based on a hit structure obtained from the Tres Cantos Antimalarial Compound Set. (Poster) DPhG Jahrestagung, Düsseldorf, 2015.

Weidner, T.; Nasereddin, A.; Preu, L.; Grünefeld, J.; Dzikowski, R.; Kunick, C., Development and characterization of new diaryl thioethers and the evaluation of their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*. (Poster) DPhG Doktorandentagung, Aachen, 2016.



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2013 bis November 2016 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. Conrad Kunick,**

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, seine hervorragende Betreuung und die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

**Herrn Prof. Dr. Knut Baumann**

für die Übernahme des Koreferats.



*Meiner Frau und meiner Familie gewidmet.*





## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Malaria .....	1
1.2 Plasmodium .....	1
1.3 Methoden zur Bekämpfung der Malaria .....	3
1.3.1 Vektorkontrolle .....	4
1.3.2 Immunisierung .....	5
1.3.3 Artemisinin und dessen Derivate .....	5
1.3.4 Synthetische Endoperoxide .....	7
1.3.5 Arylaminoalkohole .....	8
1.3.6 4-Aminochinoline .....	9
1.3.7 8-Aminochinoline .....	11
1.3.8 Inhibition der plasmodialen Atmungskette .....	12
1.3.9 Inhibitoren der Folsäuresynthese .....	13
1.3.10 Antibiotika .....	14
1.3.11 Weitere Antimalariawirkstoffe in der Entwicklung .....	15
1.4 Hochdurchsatzscreenings in der Malariaforschung .....	16
1.4.1 Target-basiertes Screening .....	16
1.4.2 Phänotypisches Screening .....	18
1.5 Coenzym A-Biosynthese von Plasmodien als potentiellies Wirkstoff-Target.....	20
2 Zielsetzung .....	26
3 Synthesen.....	29
3.1 2-Phenoxyanilide und davon abgeleitete Strukturen .....	29
3.1.1 Synthese von 2-Phenoxyaniliden .....	29

3.1.2	Analytik der 2-Phenoxyanilide .....	32
3.1.3	Synthese von 2,2-Dimethyl-1-(10 <i>H</i> -phenoxazin-10-yl)propan-1-on .....	35
3.2	Diarylthioether und davon abgeleitete Strukturen .....	37
3.2.1	Struktur-Design der Testverbindungen .....	37
3.2.2	Synthese von 1,3,4-Oxadiazol-2(3 <i>H</i> )-thionen.....	39
3.2.3	Synthese von Imidazopyridinthionen .....	42
3.2.4	Synthese von Diarylthioethern als Testverbindungen.....	43
3.2.5	Analytik der Diarylthioether .....	49
3.2.6	Synthese von Diarylaminen als Testverbindungen.....	62
4	Untersuchung des Reaktionsverlaufs der Synthese ausgewählter Diarylthioether..	64
4.1	Beobachtung von Reaktionsverläufen mittels HPLC .....	65
4.2	Umwandlung vom kinetischen zum thermodynamischen Produkt .....	73
5	Biologische Evaluierung .....	77
5.1	Biologische Aktivität der 2-Phenoxyanilide .....	77
5.2	Biologische Aktivität der Diarylthioether.....	81
5.2.1	Antiplasmodiale Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	81
5.2.2	Ergebnisse des Coenzym-A-Substitutions-Assays.....	88
5.2.3	Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests .....	93
6	Physikochemische Eigenschaften .....	96
6.1	Ro5-Eigenschaften der 2-Phenoxyanilide.....	97
6.2	Physikochemische Eigenschaften einiger Diarylthioether .....	99
7	Zusammenfassung .....	103
8	Summary .....	107
9	Experimenteller Teil .....	111
9.1	Geräte und Methoden .....	111
9.2	Synthesen und analytische Daten.....	117

9.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	117
9.2.2	Synthesevorschriften und analytische Daten der synthetisierten Substanzen . .....	121
9.2.3	Untersuchung des Reaktionsverlaufs einiger Synthesen mit Hilfe der HPLC .... .....	182
9.3	Löslichkeitsuntersuchung .....	183
9.3.1	Kalibrierung.....	183
9.3.2	Vorbereitung und Vermessung der Substanzproben .....	184
9.4	Biologische Testung .....	186
9.4.1	<i>In vitro</i> -Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität gegenüber <i>Pf</i> NF54-Luc... .....	186
9.4.2	Coenzym-A-Substitutions-Assay .....	187
9.4.3	Zytotoxizitäts-Assays.....	188
10	Literaturverzeichnis .....	193

## Abkürzungsverzeichnis

Å: Ångstrom; AAV: Allgemeine Arbeitsvorschrift; ACN: Acetonitril; ACTs: ACT Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (engl. *Artemisinin-based combination therapie*); ArH: aromatisches Proton; AUC: *area under the curve*; ber.: berechnet; bidest.: bidestilliert; Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl; br: verbreitertes Signal; BS: Blasticidin S; CoA: Coenzym A; COSY: *correlated spectroscopy*;  $\delta$ : chemische Verschiebung; d: Dublett; DAD: *diode array detector*; DC: Dünnschichtchromatographie; DCM: Dichlormethan; DDT: Dichlordiphenyltrichlorethan; DHFR: Dihydrofolat-Reduktase; DHPS: Dihydropteroat-Synthase; DIPEA: Diisopropylethylamin; DPCK: Dephospho-CoA-Kinase; DMF: *N,N*-Dimethylformamid; DMSO- $d_6$ : Hexadeuterodimethylsulfoxid; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; EI: Elektronenstoß-Ionisation; EMA: Europäische Arzneimittel-Agentur; EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*; engl.: Englisch; *et al.*: *et alii*; Et<sub>3</sub>N: Triethylamin;; FKS: Fetales Kälberserum; G6PD: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; gef.: gefunden; ges.: gesättigt; GSK: GlaxoSmithKline; HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation*; HPLC: Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*); HRMS: Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. *high resolution mass spectrometry*); HSQC: *heteronuclear single quantum coherence*; HTS: Hochdurchsatzscreening (engl. *high throughput screening*); ID: Identitätsnummer; IE: Internationale Einheit; IC<sub>50</sub>: Konzentration der halbmaximalen Inhibition (engl. *inhibitory concentration 50%*); IR: Infrarot; IRS: engl. *indoor residual spraying*; ITN: Insektizid-behandelte Moskitonetze (engl. *insecticide-treated mosquito nets*); *J*: Kopplungskonstante; konz.: konzentriert;  $\lambda_{\max}$ : Wellenlänge des Absorptionsmaximums; Lit.: Literatur; M: molar; m: Multiplett; mAU: *milli absorbance units*; [M]<sup>+</sup>: Molekülradikalkation; MHz: Megahertz; M<sub>r</sub>: relative Molmasse; MS: Massenspektrometrie;  $\mu$ w: Mikrowelle; m/z: Masse pro Ladungseinheit; nb: nicht bestimmt; NMR: Kernmagnetresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*); NPP: neuartige Permeationswege (engl. *new permeation pathways*); *P.*: *Plasmodium*; *Pf.*: *Plasmodium falciparum*; *Pf3D7*: *Plasmodium falciparum* 3D7-Parasitenstamm; *PfATP4*: Natrium-ATPase 4 von *P. falciparum*; *PfATP6*: *P. falciparum* Calcium-ATPase 6; *PfCARL*: *P. falciparum* cyclic amine resistance locus; *PfCRT*: *P. falciparum* chloroquine resistance transporter; *PfDd2*: *P. falciparum* Dd2-Parasitenstamm; *PfDHODH*: *plasmodiale*

*Dihydroorotatdehydrogenase*; PfMDR1: *P. falciparum* multidrug resistance transporter 1; PfNHE1: *P. falciparum* sodium/proton exchanger 1; PfPI4K: *P. falciparum* Phosphatidylinositol-4-Kinase; Ph: Phenyl; PPAT: Phosphopantethein-Adenylyltransferase; PPCDC: Phosphopantothenoylcystein-Decarboxylase; PPCS: Phosphopantothenat-Cystein-Synthase; ppm: *parts per million*; prim.: primär; PyBOP: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat; q: Quartett; *qs*: *quantum satis*; quin: Quintett; rpm: *revolutions per minute*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*; RT: Raumtemperatur; s: Singulett; Schmp.: Schmelzpunkt; SEM: Standardabweichung des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*); sept.: Septett; t: Triplett; TCAMS: *Tres Cantos Animalarial Compound Set*; TFA: Trifluoressigsäure; THF: Tetrahydrofuran;  $t_M$ : Totzeit;  $t_{M+S}$ : Gesamtretentionszeit; UV: Ultraviolett; WHO: Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*); Zersetz.: Zersetzung



# 1 Einleitung

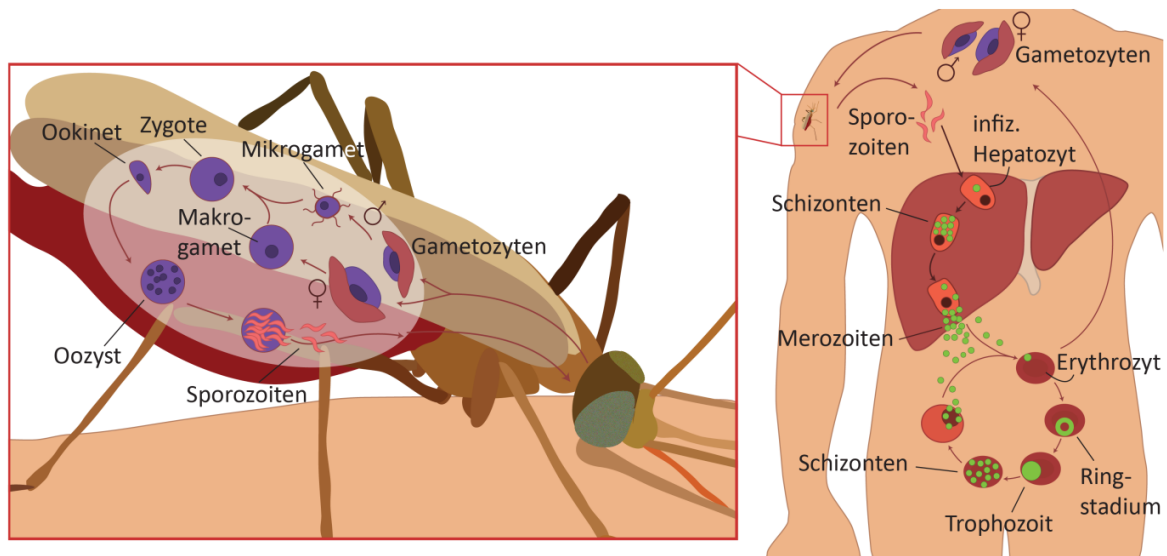
## 1.1 Malaria

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die vor allem in tropischen und subtropischen Regionen der Erde auftritt. Sie wird durch intrazelluläre Endoparasiten des Genus *Plasmodium* verursacht. Diese gehören, genauso wie *Toxoplasma gondii* und *Cryptosporidium parvum* zur Gruppe der *Apicomplexa*, welche allesamt obligate Parasiten sind; d. h. sie sind zum Überleben zwingend auf Wirte angewiesen. Bislang sind fünf humanpathogene Spezies von *Plasmodium* bekannt: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale* und *P. falciparum*.<sup>1</sup> Letztere wird für die *Malaria tropica*, die schlimmste Verlaufsform, verantwortlich gemacht und ist in Afrika die vorwiegende Spezies, während in vielen betroffenen Regionen außerhalb des afrikanischen Kontinents häufiger Infektionen durch *P. vivax* auftreten.<sup>2</sup> Etwa 9–14 Tage nach einer Infektion durch *P. falciparum* kommt es zu Grippe-ähnlichen Symptomen, wie beispielsweise Fieberschüben, Übelkeit, Schüttelfrost, Kopf-, Muskel- und Gliederschmerzen. In schwerwiegenden Fällen resultieren Krampfanfälle, Nierenversagen und Koma mit Todesfolge. Im Jahr 2015 gab es nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ca. 214 Millionen Malariainfektionen, von denen schätzungsweise 438000 tödlich endeten. Insbesondere Kinder bis zum Alter von fünf Jahren und Schwangere waren betroffen. Mehr als 80% der Infektionen traten in Afrika auf, vor allem in Regionen südlich der Sahara mit Ländern, die zu den ärmsten der Welt zählen.<sup>2</sup> Das Malaria-Risiko steht im starken Zusammenhang mit der mangelnden Infrastruktur, den wenig fortschrittlichen Gesundheitssystemen in armen Ländern und dem dadurch mangelnden Zugang zu Behandlungs- und Präventionsmaßnahmen.<sup>3</sup> Malaria ist nicht nur eine Gefahr für die Gesundheit, sondern auch eine große soziale und wirtschaftliche Belastung in den betroffenen Ländern.<sup>4</sup>

## 1.2 Plasmodium

Der Lebenszyklus von Plasmodien (Abbildung 1-1) verteilt sich auf einen Wirt wie den Menschen, in dem eine asexuelle Vermehrung stattfindet, sowie auf Moskitos, meist

Mücken der Gattung *Anopheles*, die als Vektoren fungieren und somit für die Transmission der Erreger verantwortlich sind. Innerhalb des Vektors erfolgt eine sexuelle Fortpflanzung.



**Abbildung 1-1:** Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. In Anlehnung an eine Darstellung von WIRTH<sup>5</sup>.

Die eukaryotischen Parasiten durchlaufen in ihrem Lebenszyklus verschiedene Entwicklungsstadien. Sie werden bei der Blutmahlzeit einer weiblichen Anophelesmücke über deren Speichel auf den Menschen übertragen. Dabei befinden sich die Plasmodien im Sporozoiten-Stadium und befallen zunächst Hepatozyten. In diesen entwickeln sie sich weiter zu Leberschizonten und vermehren sich dabei stark. Schließlich platzt die Leberzelle auf und die Erreger gelangen als sogenannte Merozoiten in die Blutbahn. Dort befallen sie Erythrozyten und ab dieser Phase manifestiert sich die Malaria klinisch. In den Erythrozyten befinden sich Plasmodien in einer Nahrungsvakuole, die intrazellulär an die Erythrozytenmembran angeheftet ist. Die Mehrzahl der Parasiten durchläuft danach einen asexuellen Fortpflanzungszyklus, wobei sie sich über das sogenannte Ringstadium zum reifen Trophozoiten weiterentwickeln, welcher dann wiederum in die Form eines Schizonten übergeht. In diesem Stadium erfolgt erneut eine starke ungeschlechtliche Vermehrung, bis es zur Ruptur der Erythrozyten kommt und die Parasiten erneut in die Blutbahn gelangen, sodass dieser Zyklus von neuem beginnen kann. Die erythrozytäre Schizogonie verläuft bei *P. falciparum* in einer Zeitspanne von



etwa 48 Stunden und ist für die klinischen Symptome der Malaria, z. B. die wiederkehrenden Fieberschübe, verantwortlich. Ein kleiner Anteil der Merozoiten entwickelt sich zu Gametozyten, der Form, in der Plasmodien in *Anopheles* überlebensfähig sind. Die Gametozyten, die zu weiblichen und männlichen Formen heranreifen, können bei einer erneuten Blutmahlzeit eines Moskitos in den Vektor aufgenommen werden. Die männlichen Formen differenzieren zu Flagellen-tragenden Mikrogameten, welche aus den roten Blutkörperchen heraustreten (Exflagellation) und zu den weiblichen Makrogameten schwimmen, wodurch es zur Fertilisation kommt. Über das Zygoten-Stadium entwickeln sich die Plasmodien in Ookineten und Oozysten weiter zu Sporozoiten, die dann durch einen weiteren Stich des Moskitos wieder auf den menschlichen Wirt übertragen werden können, sodass sich der Generationszyklus schließt.<sup>1, 6</sup>

Bei *P. vivax* und *P. ovale* gibt es eine Besonderheit im Lebenszyklus. Bei diesen Arten reifen nicht alle Lebersporozoiten zu Merozoiten heran. Ein Teil kann sich zu sogenannten Hypnozoiten entwickeln; ein Stadium, in dem sich die Parasiten in einer Art Ruhephase befinden und sich durch einen bisher noch nicht geklärten Stimulus erst nach Wochen oder Monaten in Merozoiten umwandeln können. Dies führt dazu, dass sich erst lange nach der Infektion ein Krankheitsbild zeigen kann.<sup>1, 6</sup>

### 1.3 Methoden zur Bekämpfung der Malaria

Die Bekämpfung von Malaria stützt sich im Wesentlichen auf drei unterschiedliche Säulen. Diese sind die Vektorkontrolle, die Prophylaxe bzw. Immunisierung von Gefährdeten und schließlich die akute Behandlung der Infektion mit Chemotherapeutika. In den Jahren von 2000 bis 2015 ist die Anzahl der Malariainfektionen um schätzungsweise 37% gesunken, die Reduktion der Todesfälle lag im selben Zeitraum sogar bei 60%.<sup>2</sup> Die genannten Maßnahmen zur Malaria-Bekämpfung haben wesentlich zur Verbesserung der Situation beigetragen. Bis zum Erreichen des Ziels einer Malaria-freien Welt, welches als Zukunftsvision von der WHO ausgesprochen wurde, ist vermutlich noch ein längerer Weg zu beschreiten. Eine Reduktion der Infektionen und Todesfälle um weitere 90% soll zunächst bis zum Jahr 2030 erreicht werden.<sup>2</sup> Mit dem

jetzigen Arsenal an Antimalariawirkstoffen, welche fast ausschließlich den asexuellen Fortpflanzungszyklus von Plasmodien adressieren<sup>7</sup>, ist eine Eliminierung der Malaria nach Meinung der Initiative *Malaria Eradication Research Agenda* (malERA) nicht möglich.<sup>8</sup> Vor allem die Tatsache, dass gegen jedes verfügbare Chemotherapeutikum, aber auch gegen viele Insektizide, Resistenzen bekannt sind, ist eine Bedrohung.<sup>2</sup> Zukünftige Therapien sollen mit der Gabe einer Dosis im besten Falle gleichzeitig vor weiteren Infektionen schützen und für eine radikale Eliminierung der Parasiten im Patienten sorgen, sodass eine Weiterverbreitung nicht mehr möglich ist.<sup>8</sup> Im Folgenden werden verschiedene Methoden zur Bekämpfung der Vektoren sowie bewährte und noch in der Entwicklung befindliche Wirkstoffe zur Therapie der Malaria dargestellt.

##### 1.3.1 Vektorkontrolle

Weitverbreitete Methoden zum Schutz vor den Vektoren sind das Versprühen von Insektiziden in Innenräumen (IRS, engl. *indoor residual spraying*) und die Verwendung von Moskitonetzen. Letztere werden zum besseren Schutz mit Insektiziden behandelt (ITNs, engl. *insecticide-treated mosquito nets*). Für IRS und ITNs werden in vielen Fällen Pyrethroide verwendet. Dies ist eine Klasse synthetischer Insektizide, die von dem natürlichen Insektizid Pyrethrum abgeleitet ist. Jedoch wurde schon in vielen Ländern eine Toleranz der Moskitos gegenüber einigen Pyrethroiden registriert. Alternative Mittel sind beispielsweise Organophosphate oder Carbamate.<sup>2,9</sup> In einzelnen Fällen wird aufgrund der guten und langanhaltenden insektiziden Wirksamkeit die Verwendung von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) von der WHO empfohlen. DDT ist für Säugetier und Mensch akut kaum toxisch, besitzt allerdings eine sehr hohe chemische Stabilität und reichert sich in Geweben von Menschen und Tieren an.<sup>10</sup> Dadurch können unerwünschte Wirkungen nicht ausgeschlossen werden, weshalb DDT durch die Stockholmer Übereinkunft verboten und dessen Anwendung nur noch in Ausnahmefällen zur Bekämpfung von Insekten, welche Krankheiten übertragen, genehmigt ist. Gegen DDT sind jedoch auch schon einige Resistenzen der Moskitos bekannt.<sup>2,9</sup>

Neben der klassischen Vektorkontrolle mittels Insektiziden sind auch Methoden zur Sterilisation der Vektoren oder gentechnische Veränderungen von Moskitos in der

Entwicklung. Beispielsweise können männliche Moskitos mittels Bestrahlung oder durch chemische Wirkstoffe sterilisiert werden, was jedoch mit sehr großem Aufwand verbunden ist, weil für eine effektive Wirkung sehr viele Individuen behandelt werden müssen.<sup>11</sup> Neuere Methoden bestehen in genetischen Manipulationen der Moskitos. Eine moderne Variante ist das sogenannte *gene drive*, bei dem es zu einer beschleunigten Vererbung von veränderten Genen innerhalb einer Population kommt.<sup>12</sup> In den Arbeiten von HAMMOND *et al.* und GANTZ *et al.* wurden mittels *gene drive* gentechnische Veränderung in *Anopheles* eingeführt, mit der Folge, dass die Moskitos weniger fruchtbar sind oder resistent gegenüber *Plasmodium* werden.<sup>13, 14</sup> Die breite Anwendbarkeit dieser alternativen Methoden zur Vektorkontrolle muss aber noch genauer untersucht werden, vor allem auch deren Auswirkungen für das Ökosystem.

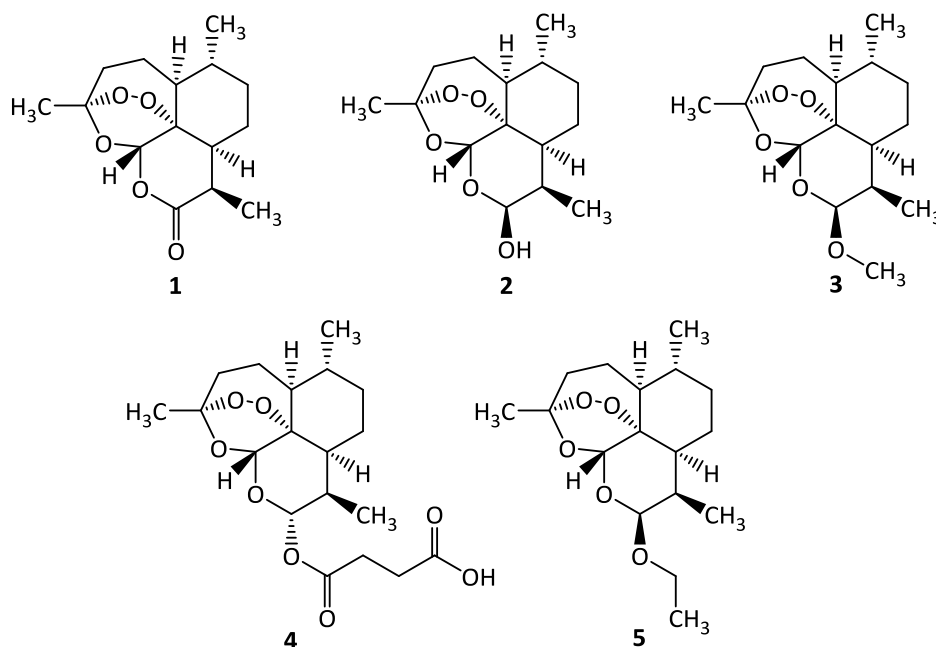
### 1.3.2 Immunisierung

Schon seit mehreren Jahrzehnten wird versucht, eine Impfung gegen Malariaerreger zu entwickeln, um insbesondere Menschen in den endemischen Gebieten vor Infektionen zu schützen. Im Sommer 2015 erhielt ein Impfstoff zum ersten Mal eine positive Empfehlung von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für die Anwendung bei Kindern im Alter von 6 Wochen bis 17 Monaten.<sup>15</sup> Die von GlaxoSmithKline (GSK) entwickelte Vakzine RTS,S/AS01 mit dem Markennamen Mosquirix® wurde gegen *P. falciparum* entwickelt und adressiert das Circumsporozoit-Protein des Erregers.<sup>16</sup> Durch die Impfung wird ein moderater Schutz vor klinischer Malaria von 33–51% im ersten Jahr nach Impfgabe bei Kindern gewährleistet. Die Effektivität nimmt nach 12 Monaten jedoch stark ab.<sup>17, 18</sup> Bei Säuglingen, die ihre erste Dosis mit 6–12 Wochen erhielten, war die Wirksamkeit gering, sodass für diese Altersgruppe von der WHO keine Empfehlung zur Immunisierung ausgesprochen wurde.<sup>18</sup>

### 1.3.3 Artemisinin und dessen Derivate

Schon in einer Abschrift von Ge Hong aus dem 3. Jahrhundert nach Christus wurden Extrakte der Qinghao (chinesischer Name für *Artemisia annua*, dem einjährigen Beifuß) zur Therapie der Malaria empfohlen.<sup>19</sup> In den 1970er-Jahren wurde von einer chinesischen Forschergruppe um Youyou Tu Artemisinin (**1**) als Wirkstoff isoliert und

dessen Struktur aufgeklärt.<sup>19, 20</sup> Für diese Arbeit erhielt Youyou Tu 2015 den Nobelpreis für Medizin. Chemisch gehört **1** zur Gruppe der Sesquiterpenlactone und enthält eine intramolekulare Peroxidbrücke, die Teil einer 1,2,4-Trioxanpartialstruktur ist. Die WHO empfiehlt Derivate des Artemisinin (Abbildung 1-2) in Form einer Kombinationstherapie (ACT, engl. *artemisinin-based combination therapy*) zusammen mit langwirksamen Präparaten wie beispielsweise Mefloquin (**9**), Lumefantrin (**11**), Amodiaquin (**13**), Piperaquin (**14**) oder der Kombination Sulfadoxin/Pyrimethamin als erste Mittel der Wahl zur Therapie gegen die unkomplizierte Form der Malaria. Artesunat (**4**) wird bei schwerwiegendem Verlauf der Malaria auch intravenös angewandt.<sup>21</sup>



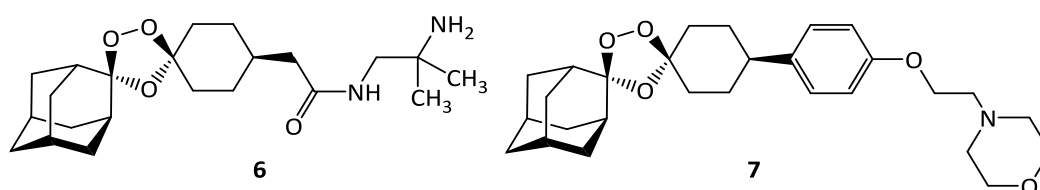
**Abbildung 1-2:** Artemisinin (**1**) und dessen semisynthetische Derivate Dihydroartemisinin (**2**), Artemether (**3**), Artesunat (**4**) und Arteether (**5**). Dihydroartemisinin ist der aktive Metabolit des Artemisinins<sup>22</sup> und dient als chemische Vorstufe der anderen semisynthetischen Derivate.

Von einer Monotherapie mit Artemisininderivaten wird abgeraten, da bereits Resistenzen des Erregers, vor allem in Regionen Südasiens, aufgetreten sind.<sup>23</sup> Die verminderte Sensitivität von *P. falciparum* für Artemisinin-Derivate soll in Zusammenhang mit einer Mutation in der sogenannten „Propellerregion“ des Kelch-Gens auf Chromosom 13 stehen.<sup>24</sup> **1** und dessen Derivate sind schnell wirksame und sehr potente Verbindungen, die gegen alle erythrozytären Stadien und die frühen Formen der

Gametocyten aktiv sind, jedoch eine geringe Bioverfügbarkeit und kurze *in vivo*-Halbwertszeiten haben.<sup>25, 26</sup> Der genaue Wirkmechanismus der Artemisinin-derivate ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird die Endoperoxidteilstruktur als essentieller Baustein für die antiplasmodiale Wirkung angesehen.<sup>27</sup> Es werden verschiedene Aktivierungsmechanismen, wie beispielsweise eine durch Eisenionen induzierte Radikalbildung, sowie verschiedene Zielstrukturen von **1** diskutiert.<sup>28</sup> Mögliche Wirkungen können die Alkylierung des Häm und verschiedener parasitärer Proteine sein.<sup>28–30</sup> Zudem werden die Inhibition von *Pf*ATP6<sup>31</sup> und eine Degradierung von Phospholipiden der Parasitenmembran durch Artemisinin erörtert.<sup>32</sup>

#### 1.3.4 Synthetische Endoperoxide

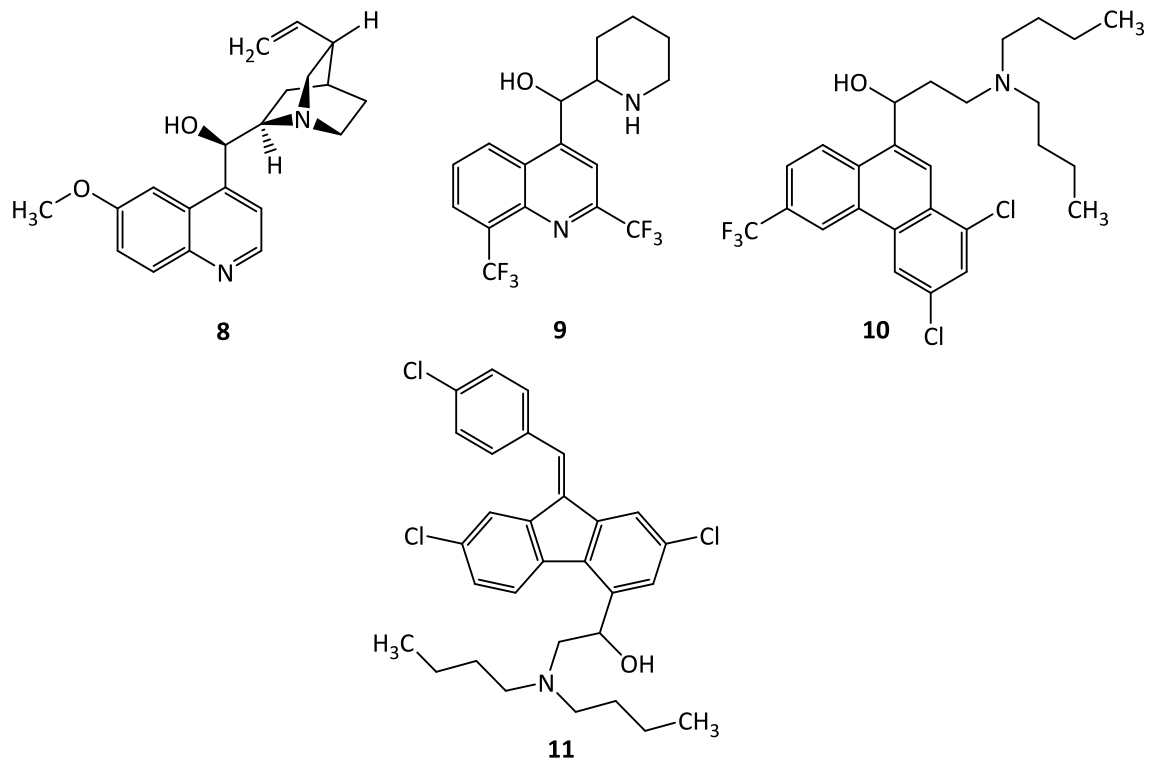
In Anlehnung an Artemisinin wurden in den letzten Jahren vollsynthetische Wirkstoffe entwickelt, die ebenfalls eine Endoperoxid-Teilstruktur enthalten (Abbildung 1-3). OZ277 (**6**), auch Arterolan genannt, wurde in fixer Kombination mit dem 4-Aminochinolin Piperaquin (**14**) 2013 in Indien zugelassen. Es soll eine ähnliche Wirksamkeit haben wie die Kombination Artemether/Lumefantrin, dafür aber kostengünstiger sein als viele ACT-Präparate.<sup>33</sup> Problematisch ist jedoch auch bei Arterolan die relativ kurze Plasmahalbwertszeit. Vor allem Interaktionen mit Eisen(II)-Ionen werden für eine erhöhte Elimination verantwortlich gemacht.<sup>26</sup> Eine Weiterentwicklung ist OZ439 (Artefenomel, **7**), bei dem im Vergleich zu **6** die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert wurden.<sup>26</sup> Momentan befindet sich **7** in Phase IIb der klinischen Prüfung in einer Kombination mit dem neu entwickelten 4-Aminochinolin Ferroquin (**16**).<sup>33</sup>



**Abbildung 1-3:** Die synthetischen Endoperoxide OZ277 (Arterolan, **6**) und OZ439 (Artefenomel, **7**).

### 1.3.5 Arylaminoalkohole

Chinin (**8**) ist einer der bisher am längsten genutzten Antimalariawirkstoffe. Es ist ein Naturstoff, der aus der Rinde von in Lateinamerika beheimateten Chinarindenbäumen isoliert wird. Die Chinarinde wurde zur Kolonialzeit aus Peru nach Europa gebracht und Mitte des 17. Jahrhunderts in Rom erstmals zur Behandlung von Malaria genutzt.<sup>34</sup> Heutzutage wird Chinin in Kombination mit Clindamycin zur Behandlung einer unkomplizierten Malaria während des ersten Trimesters einer Schwangerschaft empfohlen. Zudem wird **8**, meist in Form des Dihydrochlorids, parenteral in Fällen von schwerwiegender Malaria eingesetzt.<sup>21</sup> Die therapeutische Breite von parenteral verabreichtem Chinin ist jedoch nur gering. Eine Hypoglykämie als Folge der Behandlung mit Chinin-Derivaten ist außerdem eine bekannte Nebenwirkung, die vor allem in der Schwangerschaft problematisch ist.<sup>35</sup> Chemisch handelt es sich bei **8** um ein Chinolinalkaloid mit Arylaminoalkohol-Struktur. Es inhibiert in Plasmodien wahrscheinlich die Detoxifikation von Häm.<sup>36</sup> Beim Verdau von Hämoglobin, das der Parasit als Aminosäurequelle nutzt, kann es zur Oxidation von im Häm gebundenem Eisen(II) zu Eisen(III) kommen, was zu toxischen Folgereaktionen führt. Um diese zu unterbinden, wandelt der Parasit die reaktive Häm-Spezies, das Ferriprotoporphyrin IX, in nicht-toxisches, kristallines Hämozoin um.<sup>1, 37</sup> Dieser für Plasmodien lebensnotwendige Prozess wird vermutlich auch durch andere Arylaminoalkohole (Abbildung 1-4) wie Mefloquin (**9**), Halofantrin (**10**) und Lumefantrin (**11**) inhibiert. Eine verminderte Sensitivität von Plasmodien gegenüber Arylaminoalkoholen ist weit verbreitet und wird unter anderem mit Punktmutationen im Gen des Transportproteins *PfMDR1* (*P. falciparum multidrug resistance transporter 1*) oder mit dessen Amplifikationen assoziiert<sup>38</sup>, außerdem mit Mutationen der Gene für die Transporter *PfNHE1* (*P. falciparum sodium/proton exchanger 1*) und *PfCRT* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*).<sup>39, 40</sup> Halofantrin (**10**) wurde lange als sichere Alternative zur Behandlung multiresistenter Plasmodium-Spezies gesehen. Allerdings wurden 1993 erstmals tödliche kardiotoxische Wirkungen mit der Einnahme von **10** in Zusammenhang gebracht.<sup>41</sup> Halofantrin ist deshalb nicht für die breite Anwendung geeignet.



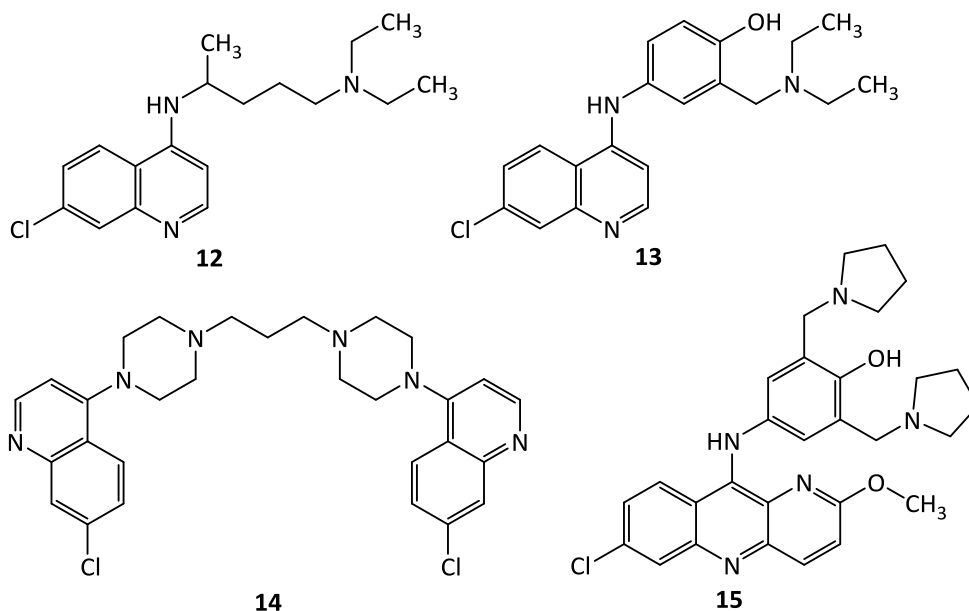
**Abbildung 1-4:** Einige Antimalariawirkstoffe aus der Gruppe der Arylaminoalkohole: Chinin (**8**), Mefloquin (**9**), Halofantrin (**10**) und Lumefantrin (**11**).

Mefloquin (**9**) besitzt eine lange Halbwertszeit von 14–18 Tagen und wurde, ähnlich wie Halofantrin (**10**), erst nach der Markteinführung mit schweren Nebenwirkungen in Verbindung gebracht. Vor allem neurotoxische und neuropsychiatrische Wirkungen werden mit **9** assoziiert.<sup>42</sup> Es wird aber auch heute noch in Antimalariamitteln verwendet, vor allem in der ACT als Partner mit langer Wirksamkeit für Artesunat. Lumefantrin (**11**) hingegen hat keine große Bedeutung als Monopräparat, es wird jedoch in Kombination mit Artemether in der ACT häufig zur Behandlung unkomplizierter Malaria eingesetzt.<sup>21</sup>

### 1.3.6 4-Aminochinoline

Diese Strukturklasse der Antimalariamittel ist strukturell verwandt mit Chinin (**8**). Die Wirkweise der 4-Aminochinoline (Abbildung 1-5) beruht wie bei Chinin darauf, die Detoxifikation von Häm zu unterbinden.<sup>1, 37</sup> Das 4-Aminochinolin Chloroquin (**12**) wurde in den 1940er Jahren entwickelt und aufgrund der guten Antimalariawirkung und Verträglichkeit viele Jahre zur Prophylaxe und Therapie eingesetzt. Die Effektivität von

**12** sank jedoch mit dem Auftreten von Resistenzen bei *P. falciparum*. Ursächlich ist vor allem die Mutation des Gens für den Transporter *PfCRT* in der Membran der intraerythrozytären Nahrungsvakuole des Parasiten. Der dadurch vermehrte aktive Transport des Wirkstoffs aus der Nahrungsvakuole des Parasiten heraus verringert signifikant dessen Effektivität.<sup>43</sup> Bei Infektionen mit *P. vivax* wurde ebenfalls in 24 Ländern eine Resistenz gegenüber **12** berichtet.<sup>2</sup> Der Arzneistoff kann jedoch auch heute noch zur Prophylaxe und Therapie in Gebieten ohne auftretende Chloroquin-Resistenz angewandt werden, sowie bei Malariainfektionen durch *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*, die alle noch als Chloroquin-sensitiv gelten.<sup>21</sup>



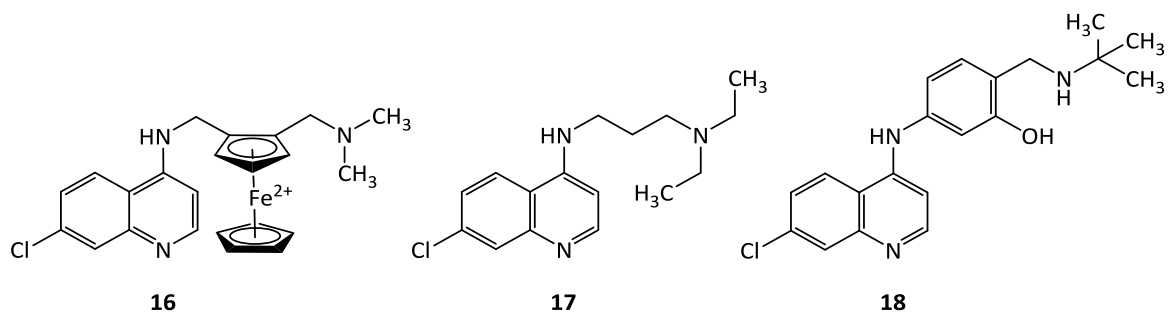
**Abbildung 1-5:** Einige bewährte 4-Aminochinolinderivate: Chloroquin (**12**), Amodiaquin (**13**), Piperaquin (**14**) und Pyronaridin (**15**).

Ein weiteres 4-Aminochinolin ist das Amodiaquin (**13**). Es ist gegen Chloroquin-resistente Plasmodium-Spezies wirksam<sup>44</sup>, zeigt aber starke Nebenwirkungen wie Lebertoxizität und Agranulozytose<sup>45</sup> und ist deshalb hauptsächlich nur in geringen Dosen in fixer Kombination mit Artesunat in der ACT im Einsatz. Es wird in Kombination mit Sulfadoxin/Pyrimethamin von der WHO auch für Schwangere und Kinder zur saisonalen Chemoprophylaxe in Perioden mit sehr hoher Infektionswahrscheinlichkeit empfohlen.<sup>2</sup> Piperaquin (**14**) ist ebenfalls ein Derivat des Chloroquins und wird in Kombination mit Arterolan (**6**) oder Dihydroartemisinin (**2**) eingesetzt.<sup>33</sup> Aufgrund der langen



Halbwertszeit stellt es ein gutes Kombinationspräparat für das nur kurz wirksame Artemisinin-Derivat dar.<sup>46</sup> Das in den 1960er Jahren entwickelte Bis-Chinolin-Derivat wurde in den ersten 20 Jahren nach seiner Einführung intensiv in China und Südostasien zur Malariaprophylaxe und -therapie genutzt. Schließlich traten Piperaquin-Resistenzen auf, weshalb die Anwendung als Monopräparat heute nur noch von wenig Bedeutung ist.<sup>47</sup> Pyronaridin (**15**) enthält ebenfalls eine 4-Aminochinolin-Teilstruktur und wird in fixer Kombination mit Artesunat als ACT-Produkt vermarktet.<sup>33</sup>

In den vergangenen Jahren wurden neu entwickelte Wirkstoffe aus der Klasse der 4-Aminochinoline klinisch geprüft (Abbildung 1-6). Ein Beispiel ist das Ferroquin (**16**) mit einer Ferrocen-Teilstruktur. Es wurde zunächst als Kombinationspräparat mit Artesunat untersucht und befand sich bereits in der klinischen Phase II, wird nun aber als Teil einer fixen Kombination mit dem ebenso noch in der Entwicklung befindlichen synthetischen Endoperoxid OZ439 (**7**) untersucht. Weitere 4-Aminochinoline in klinischer Entwicklung sind AQ-13 (**17**), das dem Chloroquin sehr ähnlich ist, und *N*-*tert*-Butylisoquin (**18**), eine Weiterentwicklung des Amodiaquins.<sup>33</sup>

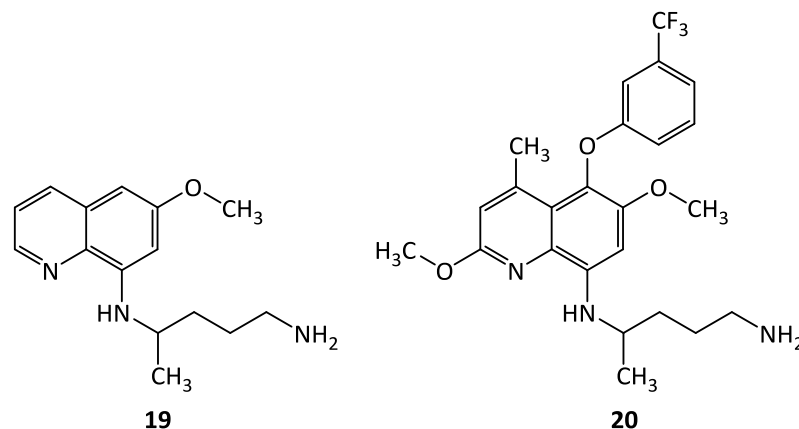


**Abbildung 1-6:** Einige 4-Aminochinoline, die sich in der Entwicklung befinden: Ferroquin (**16**), AQ-13 (**17**) und *N*-*tert*-Butylisoquin (**18**).

### 1.3.7 8-Aminochinoline

Bei Infektionen durch *P. vivax* und *P. ovale* (*Malaria tertiana*) kann es durch Hypnozoiten auch Wochen nach einer Infektionen zu klinischen Malariasymptomen kommen. Primaquin (**19**) ist als einziges zugelassenes Mittel gegen diese ruhenden Leberstadien von Plasmodien aktiv.<sup>1</sup> Es wird deshalb von der WHO als Mittel der Wahl zur Prophylaxe

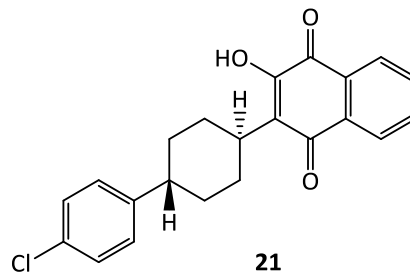
und Behandlung der *Malaria tertiana* empfohlen. Der Wirkmechanismus von **19** ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Bei Menschen, die aufgrund eines genetischen Polymorphismus einen Glucose-6-phosphatdehydrogenase(G6PD)-Mangel aufweisen, führt **19** zu einem erhöhten Risiko für eine hämolytische Anämie.<sup>21</sup> In afrikanischen und südostasiatischen Malaria-Endemiegebieten existiert eine erhöhte Prävalenz für einen G6PD-Mangel, der möglicherweise auch zu einem erhöhten Schutz gegen eine Infektion führt.<sup>48</sup> Eine Weiterentwicklung von **19** ist das Tafenoquin (**20**) (Abbildung 1-7), dessen klinische Prüfung 2014 abgeschlossen wurde und das nun kurz vor der Markteinführung steht.<sup>33</sup> Es soll nach Gabe einer einzigen Dosis den gleichen therapeutischen Effekt haben wie **19** nach zweiwöchiger Einnahme.<sup>49</sup> Jedoch besteht auch bei Tafenoquin die Gefahr der hämolytischen Anämie bei einem G6PD-Mangel.<sup>33</sup>



**Abbildung 1-7:** Die 8-Aminochinoline Primaquin (**19**) und Tafenoquin (**20**).

### 1.3.8 Inhibition der plasmodialen Atmungskette

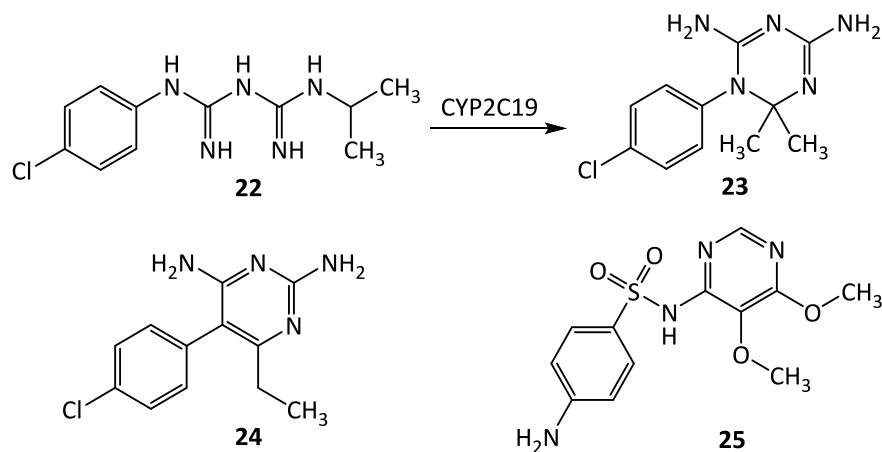
Das Naphthochinonderivat Atovaquon (**21**) unterbindet den mitochondrialen Elektronentransfer im für Protozoen spezifischen Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex und hemmt somit die Atmungskette.<sup>1, 50</sup> Es wird häufig in Kombination mit Proguanil (**22**) zur Prophylaxe für Reisende in Malariaregionen angewandt. Wegen der starken Neigung zu Einzelmutationen im Gen von Cytochrom b und der damit einhergehenden Resistenzentwicklung ist eine Anwendung in den endemischen Regionen nicht empfehlenswert.<sup>21, 51</sup>



**Abbildung 1-8:** Atovaquon (**21**), ein Inhibitor der Atmungskette von Protozoen.

### 1.3.9 Inhibitoren der Folsäuresynthese

Proguanil (**22**) ist ein Prodrug, das mittels Metabolisierung durch CYP2C19 in Cycloguanil (**23**), den aktiven Metaboliten, umgewandelt wird (Abbildung 1-9). Cycloguanil, ein 1,3,5-Triazin-Derivat, inhibiert die plasmodiale Dihydrofolat-Reduktase (DHFR).<sup>1</sup> Einzelnukleotidmutationen im Gen der DHFR führen zur Resistenzbildung.<sup>52</sup> In der Kombination mit Atovaquon sorgt hauptsächlich **22** und weniger der aktive Metabolit für einen synergistischen Effekt und senkt so die effektive Dosis des Naphthochinonderivats.<sup>21</sup>



**Abbildung 1-9:** Bewährte Inhibitoren der Folsäurebiosynthese: Cycloguanil (**23**), das aus dem Prodrug Proguanil (**22**) hervorgeht, Pyrimethamin (**24**) und das Sulfonamid Sulfadoxin (**25**).

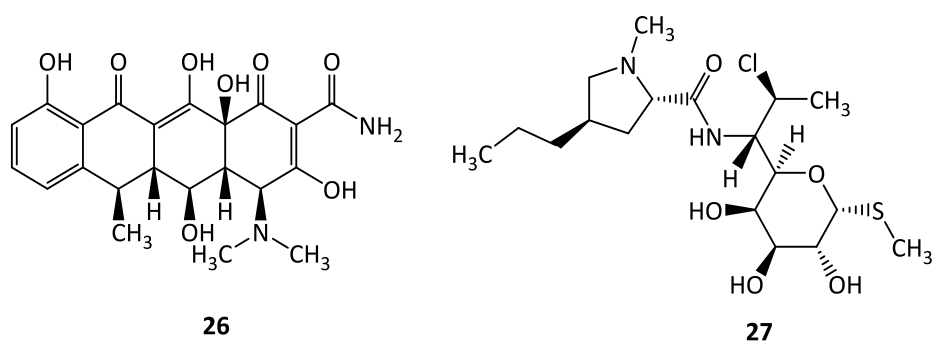
Pyrimethamin (**24**) ist strukturverwandt mit **23** und inhibiert ebenfalls die DHFR. Es wird vor allem in Kombination mit dem Antibiotikum Sulfadoxin (**25**) angewandt, einem Sulfonamid, das die Dihydropteroat-Synthase (DHPS) kompetitiv hemmt. Die

kombinierte Inhibition der DHFR und der DHPS, beides Enzyme der Folsäure-Biosynthese, sorgt für einen synergistischen Effekt, der die antiplasmodiale Wirkung verstärkt.<sup>21</sup> Durch Mutationen der Gene für DHFR und DHPS sind weitverbreitet Resistenzen gegen Pyrimethamin/Sulfadoxin aufgetreten.<sup>53–55</sup> Trotz allem wird die Kombination gemeinsam mit Amodiaquin zur saisonalen Chemoprophylaxe in Gebieten mit hoher Infektionswahrscheinlichkeit von der WHO empfohlen. Zusammen mit Artesunat findet sie zudem Anwendung als Teil der ACT.<sup>21</sup>

In der präklinischen Entwicklungsphase befindet sich mit P218 ein weiterer spezifischer Inhibitor der DHFR. Dieser soll auch gegen Antifolat-resistente Erregerstämme aktiv sein.<sup>56</sup>

### 1.3.10 Antibiotika

Doxycyclin (**26**) und Clindamycin (**27**, Abbildung 1-10) werden bei schwerwiegendem Verlauf der Malaria zur Nachbehandlung eingesetzt. Doxycyclin, ein Breitspektrumantibiotikum mit Tetracyclinstruktur, wird dabei hauptsächlich in Kombination mit Chinin (**8**) oder Artesunat (**4**) angewandt. Es kann auch zur Prophylaxe als Monopräparat verwendet werden. Bekannte Nebenwirkungen sind das Auftreten von Zahn- und Knochenschädigungen bei Kindern, auch schon im Mutterleib, weshalb **26** bei Schwangeren und Kindern unter 8 Jahren kontraindiziert ist.



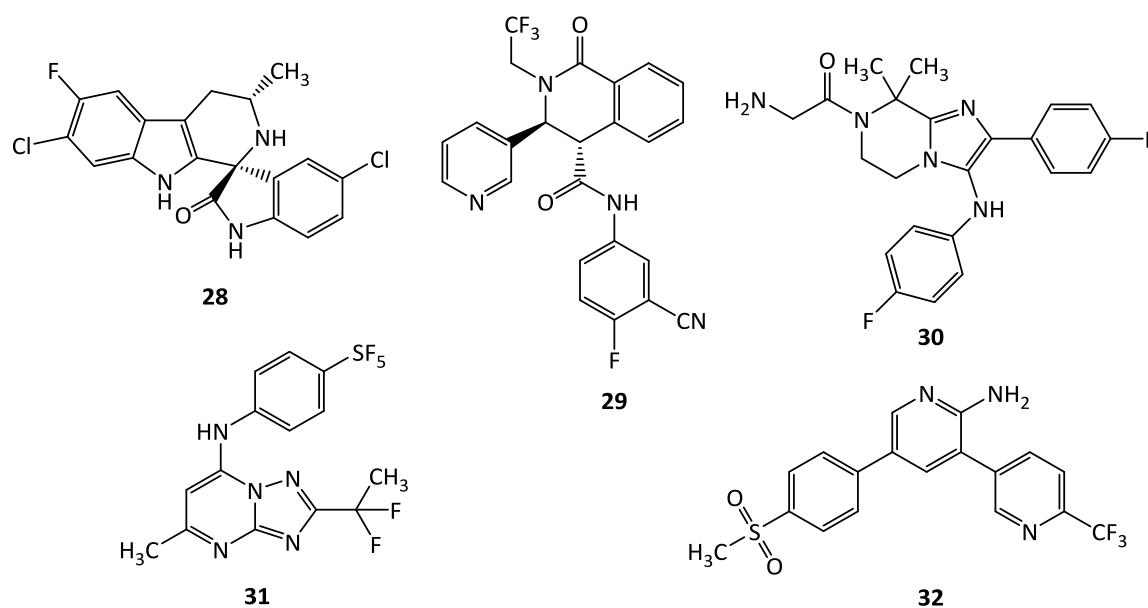
**Abbildung 1-10:** Die zur Malariatherapie eingesetzten Antibiotika Doxycyclin (**26**) und Clindamycin (**27**).

Clindamycin (**27**) ist ein Lincosamid, das seine antimikrobielle Wirkung durch Bindung an die ribosomale 50S Untereinheit entfaltet und dadurch die Proteinsynthese unterbindet.

Zur Behandlung der schwerwiegenden Malaria wird **27** in Kombination mit Artesunat (**4**) oder Chinin (**8**) eingesetzt. Es kann auch bei einer unkomplizierten Verlaufsform der Malaria während einer Schwangerschaft angewendet werden.<sup>21</sup>

### 1.3.11 Weitere Antimalariawirkstoffe in der Entwicklung

In den vergangenen Jahren gab es vermehrt Publikationen über die Entwicklung von Substanzen, die neue, bisher noch nicht adressierte Zielstrukturen in Plasmodien ansprechen. Beispielhaft sind hier Kandidaten genannt, die bereits die klinische Prüfung im Menschen durchlaufen<sup>57</sup>: KAE609 (**28**) und (+)-SJ733 (**29**), die die plasmodiale Natrium-ATPase 4 (*Pf*ATP4) inhibieren<sup>58, 59</sup>, KAF156 (**30**), das an den *cyclic amine resistance locus* (*Pf*CARL) bindet<sup>60</sup>, DSM265 (**31**), das die Dihydroorotatdehydrogenase (*Pf*DHODH) und somit die Pyrimidin-Biosynthese inhibiert<sup>61</sup>, sowie MMV390048 (**32**), das die Phosphatidylinositol-4-Kinase (*Pf*PI4K) hemmt<sup>62</sup> (Abbildung 1-11).



**Abbildung 1-11:** Einige Antimalariawirkstoffe, die sich in der Entwicklung befinden: KAE609 (**28**), (+)-SJ733 (**29**), KAF156 (**30**), DSM265 (**31**), MMV390048 (**32**).

## 1.4 Hochdurchsatzscreenings in der Malariaforschung

Das englische Verb „*to screen sth.*“ hat unter anderem die Bedeutung etwas zu überprüfen, zu rastern oder zu durchsieben. Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Wirkstoffen bezeichnet das Screening die Überprüfung von Substanzen hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung. Hochdurchsatzscreenings (HTS, engl. *high throughput screening*) sind in Kampagnen zur Wirkstoffentwicklung ein möglicher Ausgangspunkt, um neue Leitstrukturen zu finden, die dann durch weitere Optimierungsschritte zu Arzneistoffkandidaten weiterentwickelt werden können. Hierbei werden Stoffbibliotheken, die mehrere Millionen Substanzen enthalten können, auf Verbindungen mit biologischer Wirkung (sog. Hit-Verbindungen) durchsucht. Aufgrund der großen Substanzanzahl sind HTS-Kampagnen meist automatisiert und deshalb auf moderne Technologien angewiesen.<sup>63</sup> In den vergangenen Jahren gab es im Bereich der Assay-Entwicklung sehr große Fortschritte. Die Verbesserung der Handhabung flüssiger Medien, der Einsatz von Robotern zur Automatisierung und die Miniaturisierung von Assays sind Gründe dafür, warum ein HTS heute mit sehr großen Substanzzahlen und vergleichsweise kostengünstig durchgeführt werden kann.<sup>7</sup>

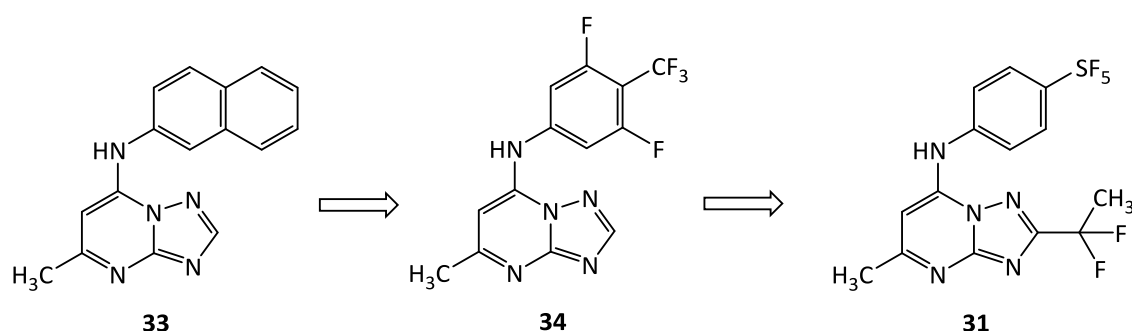
Es wird zwischen Target-basierten und phänotypischen Screeningmethoden unterschieden. Im ersten Fall erfolgt die Untersuchung der Testsubstanzen an isolierten Zielstrukturen, bei welchen es sich häufig um regulatorische Proteine, wie beispielsweise Enzyme oder Rezeptoren, handelt.<sup>64</sup> In phänotypischen Screenings wird die biologische Untersuchung hingegen an ganzen Zellen oder Organismen durchgeführt. Als dritte Variante kommt das virtuelle Screening hinzu, bei dem die Untersuchungen ausschließlich *in silico* erfolgen. Auf letzteres wird in dieser Arbeit nicht eingegangen.

### 1.4.1 Target-basiertes Screening

In der Wirkstoffentwicklung wird das Target-basierte Screening genutzt, um sogenannte Hit-Strukturen zu finden, die dann häufig zum rationalen Design von neuen Wirkstoffen genutzt werden. Hit wird eine Verbindung dann genannt, wenn sie im Screening vorher willkürlich festgelegte Eigenschaften, wie beispielsweise einen Mindestwert der Inhibition, erfüllen kann. Target-basierte Screenings sind meist einfacher zu handhaben

als phänotypische Screenings, besitzen eine höhere Robustheit und sind deshalb auch leichter als Hochdurchsatzscreening zu verwirklichen.<sup>65</sup> Es werden Substanzbibliotheken an einer definierten Zielstruktur untersucht, deren Inhibition oder Aktivierung sich beispielsweise auf einen oder mehrere Signalwege auswirken, sodass eine bestimmte Funktionsänderung im Organismus erzielt wird. Einen gezielten Angriffspunkt für einen Wirkstoff und dessen biologische Wirkung zu identifizieren, die Zielstruktur zu isolieren und in größeren Mengen für *in vitro*-Tests bereitzustellen, ist eine Voraussetzung für das Target-basierte Screening. Es sind allerdings bisher im Bereich der Infektionskrankheiten nur wenige validierte Wirkstoff-Targets bekannt.<sup>66</sup> Wurde jedoch ein Protein als Zielstruktur validiert und stehen zudem Kristallstrukturen oder Homologiemodelle für das Protein zur Verfügung, können ausgehend von Hit-Strukturen Liganden computergestützt rational modifiziert werden. Dadurch können Wirkstoffe gezielt optimiert werden, um ihre Bindung am Target zu steigern, Nebenwirkungen zu verringern, oder um physikochemische oder metabolische Eigenschaften zu verbessern. Es sollte immer überprüft werden, ob die im Target-basierten Screening gefundene Struktur auch wirklich die gewünschte Funktionsänderung im Organismus auslöst, was häufig bei *in vivo*-Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte.<sup>65</sup> Ein Nachteil des Target-basierten Screenings ist, dass die Aufnahme einer Substanz in die Zelle nicht überprüft wird, wodurch eine Verbesserung der *in vivo*-Aktivität einer Verbindung oft schwieriger zu erzielen ist.<sup>67</sup>

Das antiplasmodial wirksame DSM265 (**31**) wurde als Inhibitor der *Pf*DHODH entwickelt und ist ein Beispiel für einen Wirkstoffkandidaten, dessen Ursprung in einem Target-basiertem HTS liegt.<sup>68</sup> Der HTS-Hit (**33**) wurde durch strukturbasiertes Design kontinuierlich optimiert (Schema 1-1), wodurch sowohl die metabolische Stabilität als auch die antiplasmodiale Aktivität verbessert werden konnte, aber gleichzeitig auch die Hemmwirkung an *Pf*DHODH erhalten blieb.<sup>68</sup>



**Schema 1-1:** Die Hit-Struktur **33** aus einem HTS zur Identifikation von *PfdHODH*-Inhibitoren war metabolisch instabil. Eine Modifikation der Struktur zu **34** konnte dieses Problem beheben, jedoch wurde die antiproliferative Wirkung gegen *P. falciparum* verschlechtert. Durch die Einführung des  $\text{CF}_2\text{CH}_3$ -Substituenten wurde eine schmale hydrophobe Tasche im Enzym bedient und mit **31** eine Aktivitätssteigerung erreicht.<sup>68</sup> Abbildung in Anlehnung an eine Darstellung von WELLS *et al.*<sup>33</sup>

#### 1.4.2 Phänotypisches Screening

Bei phänotypischen Screenings wird nicht die biologische Aktivität einer Substanz an einer isolierten Zielstruktur untersucht, sondern die an einem komplexen System wie ganzen Zellen oder Organismen. Fortschritte bei der Automatisierung und die Entwicklung neuer Assay-Technologien und damit einhergehende Kostensenkungen ermöglichten es, in jüngster Zeit auch komplexe Systeme in Form eines HTS zu untersuchen.<sup>33</sup> In der Malariaforschung wurde hierdurch eine Vielzahl von Hit-Substanzen entdeckt. Im Vergleich zu Target-basierten Screenings kann eine potentielle Leitstruktur auch ohne eine validierte Zielstruktur im Organismus gefunden werden. Gleichbedeutend damit ist aber auch, dass die biologische Wirkung einer Hit-Substanz auf die Zelle oder den Organismus nicht eindeutig einer Zielstruktur zuzuordnen ist. So können beispielsweise auch mehrere Targets durch die Hit-Substanz adressiert werden.<sup>69</sup>

Bei der Entwicklung eines Wirkstoffs ist es von Bedeutung, das pharmakologische Profil zu beachten. Das heißt, auch schon in einer frühen Phase der Entwicklung die physikochemischen Eigenschaften bei der Optimierung der Struktur einzubeziehen. Durch phänotypische Screenings können die Löslichkeit, Membrangängigkeit und damit die Aufnahme einer Substanz in die Zelle direkt mit überprüft werden. Jedoch können im



phänotypischen Screening Verbindungen, die eine gute Target-spezifische Inhibition zeigen würden, aber schlecht durch Membranen permeieren, übersehen werden.<sup>66, 69</sup>

In den vergangenen Jahren hat das phänotypische Screening im Bereich der vernachlässigten tropischen Krankheiten, vor allem in der Malariaforschung, eine Art Renaissance erlebt. Die Mehrzahl der in der Entwicklung befindlichen antiplasmodialen Wirkstoffkandidaten der letzten sieben Jahre wurde durch ein phänotypisches Screening entdeckt.<sup>33</sup> Einige der großen Pharmaunternehmen haben Substanzbibliotheken zur Verfügung gestellt oder selbst untersucht. In groß angelegten HTS-Kampagnen wurden beispielsweise von Novartis<sup>70, 71</sup>, GlaxoSmithKline (GSK)<sup>72</sup>, einer Initiative des St. Jude Children's Research Hospital<sup>73</sup>, dem Medical Research Council Technology<sup>74</sup>, dem Ekitis Institute for Drug Discovery der australischen Griffith Universität<sup>75–77</sup> oder auch von der Drug Discovery Unit der Universität von Dundee<sup>78</sup> eine sehr große Anzahl von Substanzen untersucht. In den letzten Jahren wurden insgesamt etwa sechs Millionen Verbindungen mittels phänotypischer Screenings überprüft, wobei mehr als 25000 Substanzen das Wachstum von Plasmodien mit einer halbmaximalen Inhibitorkonzentration  $< 1 \mu\text{M}$  hemmen.<sup>33</sup>

Ein Großteil dieser Verbindungen geht auf die Initiative von GSK zurück, bei der etwa zwei Millionen Verbindungen in einem initialen Screening mit einer Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  gegen den Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 (*Pf3D7*) untersucht wurden. Dabei wurden 13533 Verbindungen, die das Wachstum von *Pf3D7* wenigstens um 80% verringern, als Hits bestätigt und im sogenannten *Tres Cantos Antimalarial Compound Set* (TCAMS) zusammengefasst.<sup>72</sup> Das TCAMS wurde, wie die Hit-Strukturen vieler anderer HTS-Initiativen, in der ChEMBL-Datenbank des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) für die freie Verwendung und explizit zur Weiterentwicklung von neuartigen Leitstrukturen bereitgestellt (<https://www.ebi.ac.uk/chemblntd/>). Nur 10% der TCAMS-Verbindungen haben ein chemisches Gerüst wie einer der bekannten Antimalariawirkstoffe (s. Abschnitt 1.3.). Die Aktivität der Mehrzahl der Hit-Verbindungen könnte deshalb auf neuen Wirkmechanismen beruhen und die Substanzen somit die bekannten Resistenzen umgehen. Dies konnte indirekt bei dem Screening der Verbindungen gegen den multiresistenten *P. falciparum*-Stamm Dd2

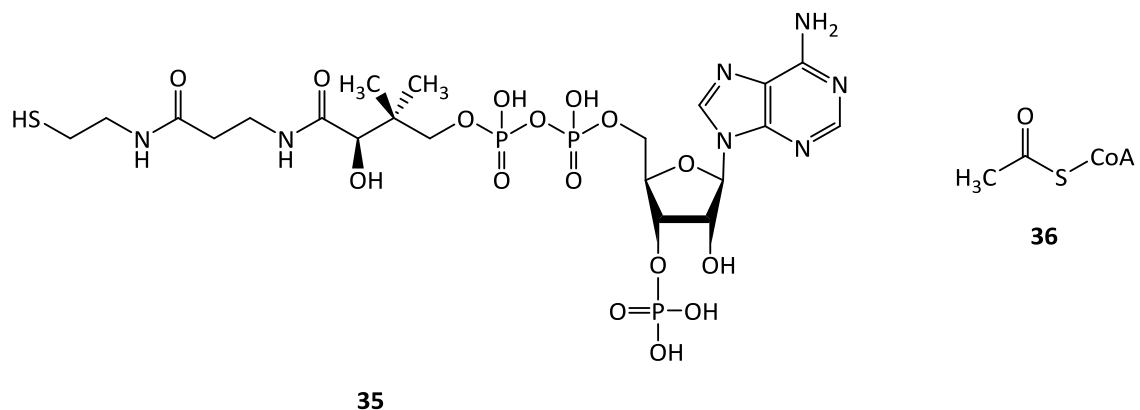
(PfDd2) untersucht werden, das zusätzlich zu dem Screening gegen Pf3D7 durchgeführt wurde. Hierbei wurde gezeigt, dass etwa 8000 Verbindungen des TCAMS das Wachstum von PfDd2 bei einer Testkonzentration von 2  $\mu$ M um mindestens 50% hemmen und somit ein Großteil der Substanzen auch gegen einen multiresistenten Erreger aktiv sind.<sup>72</sup> Eine derartige Kollektion von aktiven Verbindungen bietet viele mögliche Ausgangspunkte für die Wirkstoffentwicklung. Einige der im TCAMS enthaltenen Substanzklassen, wie beispielsweise Cyclopropylcarboxamide<sup>79</sup>, 2-Amino-1-phenylethanol<sup>80</sup>, Aminohydantoine<sup>81</sup> oder Carbamoyltriazole<sup>82</sup> wurden schon weitergehend untersucht.

Ein im Screening des *Novartis Institute for Tropical Diseases*<sup>70</sup> gefundener Hit mit Spiroindolon-Struktur wurde zu KAE609 (**28**) weiterentwickelt<sup>58</sup> und steht nun als erster Kandidat aus einer der großen phänotypischen Screening-Kampagnen kurz vor Abschluss von Phase II der klinischen Entwicklung. Die Substanz könnte seit 1996 die erste Verbindung mit einem neuartigen Chemotyp werden, die als Antimalariawirkstoff zugelassen wird.<sup>7</sup> MMV390048 (**32**), momentan noch in Phase I der klinischen Prüfung, wurde ebenso auf Basis einer Hit-Struktur aus einem phänotypischen HTS der kommerziell verfügbaren SoftFocus Kinasebibliothek entwickelt.<sup>76</sup> Bei beiden genannten Beispielen wurde das jeweilige Target (PfATP4 bzw. PfPI4K) erst im Laufe der Entwicklung identifiziert und weder PfATP4 noch PfPI4K waren vorher als Zielstrukturen klinisch validiert. Phänotypische Screenings können demnach auch Grundlage für die Entdeckung neuer Targets sein. So wurden durch phänotypische Screening-Programme mit anschließender Optimierung von Leitstrukturen und Target-Identifizierung seit 2010 sieben neue molekulare Zielstrukturen als Targets in Plasmodien validiert.<sup>33</sup>

### 1.5 Coenzym A-Biosynthese von Plasmodien als potentiellles Wirkstoff-Target

Coenzym A (CoA, **35**) ist in vielen Lebewesen als essentieller Bestandteil in wichtigen Stoffwechselprozessen involviert. Die Thiolgruppe der Cysteamin-Teilstruktur von CoA dient dabei als Bindungspartner für Carboxylgruppen zur Bildung von energiereichen Thioestern wie beispielsweise Acetyl-CoA (**36**), dem Thioester aus CoA und Essigsäure (Abbildung 1-12). **36** entsteht als Endprodukt von Glykolyse und Fettsäureabbau ( $\beta$ -

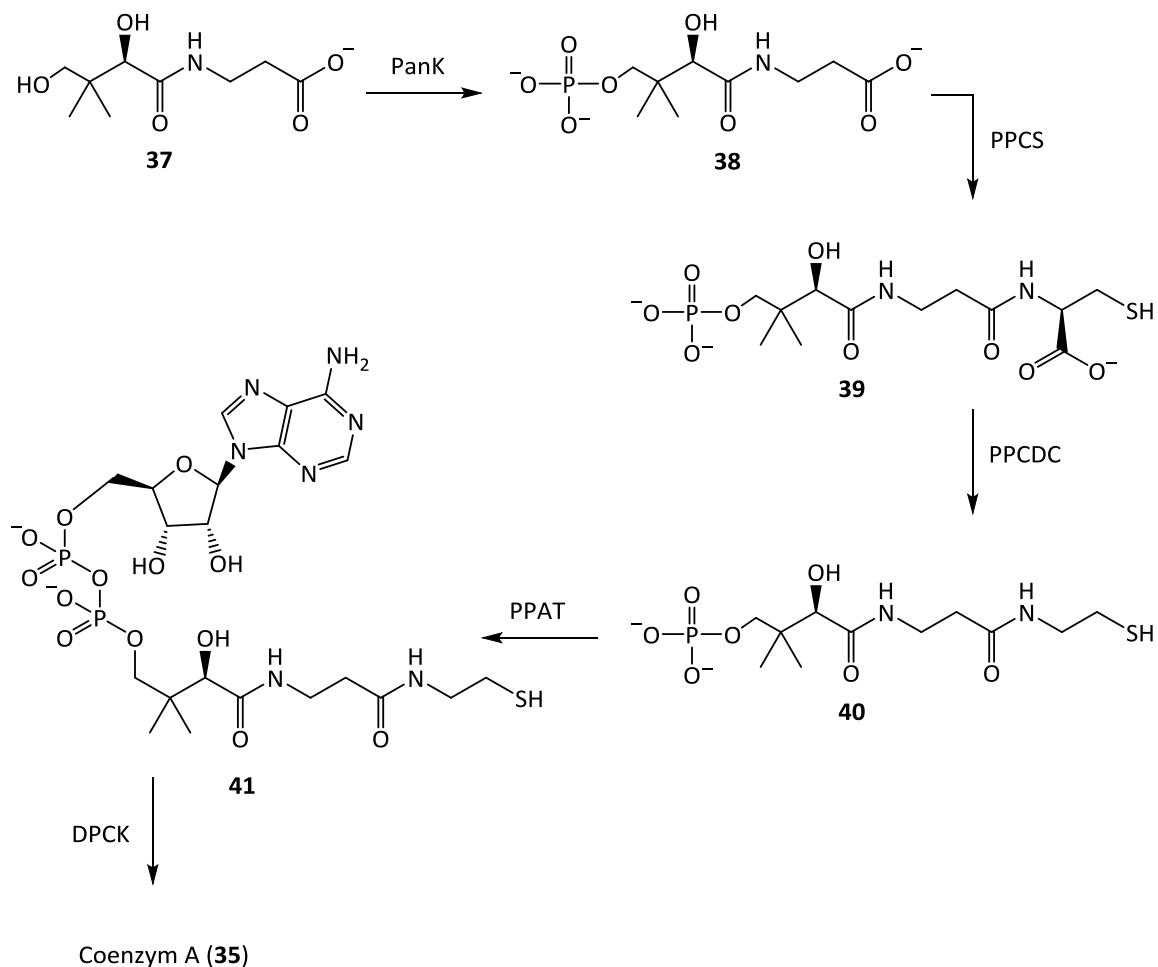
Oxidation). Es ist das zentrale Molekül, das von vielen Organismen zur Energiegewinnung über den Citratzyklus und die Atmungskette genutzt wird. Zudem ist **36** auch der Ausgangspunkt für die Synthese von Fettsäuren, Triglyceriden oder Cholesterin.



**Abbildung 1-12:** Coenzym A (**35**) und Acetyl-CoA (**36**).

Wie bei anderen Organismen ist CoA auch für Plasmodien ein essentieller Bestandteil von Stoffwechselprozessen, jedoch sind sie nicht auf die exogene Aufnahme von CoA angewiesen<sup>83, 84</sup>, was vermuten lässt, dass der Parasit den Cofaktor *de novo* synthetisieren kann. Im Genom von *P. falciparum* wurden zudem mit Hilfe computergestützter Methoden Kandidaten für die nötigen Enzyme der Coenzym A-Biosynthese gefunden.<sup>85, 86</sup> Der Biosyntheseweg von CoA (Schema 1-2) ist ein sehr konservierter Prozess in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen<sup>85</sup>, wodurch die Wichtigkeit von CoA widerspiegelt wird. Der erste Schritt der Synthese, die Phosphorylierung von Pantothenat (**37**) durch Pantothenatkinase (Pank), ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in vielen Organismen. Plasmodien können Pantothenat im Gegensatz zu einigen Bakterien und Pilzen nicht selbst herstellen und müssen **37** deshalb aus exogenen Quellen aufnehmen. Das Produkt der Pank-Reaktion, das 4'-Phosphopantothenat (**38**), wird in einer Kondensationsreaktion mit Cystein unter Katalyse der Phosphopantothenat-Cystein-Synthase (PPCS) zu 4'-Phosphopantothenoylecystein (**39**) umgesetzt. Anschließend Decarboxylierung durch die Phosphopantothenoylecystein-Decarboxylase (PPCDC) ergibt 4'-Phosphopantethein (**40**), das hiernach durch die Phosphopantethein-Adenylyltransferase (PPAT) mit einem Molekül

Adenosinmonophosphat verknüpft wird. Im letzten Schritt wird das Adenosin des Dephospho-Coenzym A (**41**) an der 3-OH-Gruppe durch die Dephospho-CoA-Kinase (DPCK) phosphoryliert, wodurch Coenzym A (**35**) erhalten wird.<sup>84</sup> Die DPCK weist eine Lokalisationssequenz für den Apikoplasten auf, einem mit vier Membranen umhüllten Plastiden des Parasiten. Alle anderen erwähnten Enzyme der CoA-Synthese befinden sich im Cytosol des Parasiten (Abbildung 1-13).<sup>87</sup>



**Schema 1-2:** Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von Coenzym A (**35**). PanK: Pantothenatkinase, PPCS: Phosphopantothenat-Cystein-Synthase, PPCDC: Phosphopantothenoylcystein-Decarboxylase, PPAT: Phosphopantethein-Adenylyltransferase, DPCK: Dephospho-CoA-Kinase.

Die beteiligten Enzyme konnten, mit Ausnahme von PanK, bisher nicht mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden.<sup>87</sup> Die durch die Analyse des Genoms prognostizierten Enzyme für *P. falciparum* sind in Tabelle 1-1 dargestellt. Neben

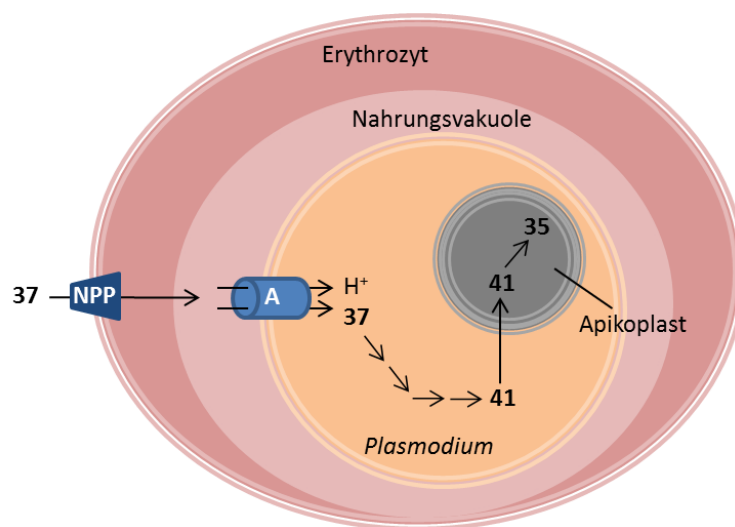
dem Schlüsselenzym PanK sollen auch PPCDC und PPAT essentiell für Plasmodien sein.<sup>88</sup>  
<sup>89</sup> Für PanK gibt es vermutlich zwei plasmodiale Homologe (PF14\_0200 und PF14\_0354). Eine Untersuchung der Sequenzhomologie aller beteiligten Enzyme zeigt, dass diese nur eine geringe Übereinstimmung zu den humanen Homologen aufweisen. Die Ähnlichkeit der beiden Pantothenatkinasen zum analogen humanen Enzym beträgt beispielsweise nur 26% bzw. 33%.<sup>90, 91</sup> Dadurch können möglicherweise selektive Effektoren des plasmodialen CoA-Synthesewegs gefunden werden, was diesen zu einem potentiellen Angriffsort für Antimalariawirkstoffe macht. Bisher genutzte Antimalariamittel adressieren die Inhibition des CoA-Metabolismus nicht. Dies hat zur Folge, dass die Resistenzen der Parasiten gegen aktuell verwendete Wirkstoffe durch eine Hemmung der Biosynthese des Coenzym umgangen werden könnten.

**Tabelle 1-1:** Die Enzyme der CoA-Biosynthese und die Identifikationsnummern der prognostizierten Analoga bei *P. falciparum*.<sup>90</sup>

Enzym der CoA-Biosynthese	Analoga bei <i>P. falciparum</i>
Pantothenatkinase	PF14_0200; PF14_0354
Phosphopantothenat-Cystein-Synthase	PFD0610w
Phosphopantothenoylcystein-Decarboxylase	Mal8P1_81
Phosphopantethein-Adenylyltransferase	PF07_0018
Dephospho-CoA-Kinase	PF14_0415

Neben den Enzymen des Biosynthesewegs von CoA sind auch Proteine von indirekt beteiligten Prozessen, wie dem Pantothenat-Transport (Abbildung 1-13) oder von nachfolgenden von CoA-abhängigen Stoffwechselprozessen mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe. Das plasmodiale Transportprotein für **37** unterscheidet sich deutlich vom humanen Äquivalent. Die Aufnahme von Pantothenat beim Menschen erfolgt durch Natrium-Pantothenat-Symporter. Nicht jedoch bei Plasmodien: SALIBA und KIRK konnten zeigen, dass die Parasiten im erythrozytären Stadium einen protonenabhängigen Transporter zur Aufnahme von **37** nutzen und dieser eine deutlich geringere Substrataffinität aufweist als der humane Natrium-Pantothenat-Symporter.<sup>92</sup> Bevor

Pantothenat in den Parasiten transportiert wird, gelangt es durch neuartige Permeationswege (NPP, engl. *new permeation pathways*) vermehrt in den Erythrozyten.<sup>93</sup> Der Einbau von NPPs in die Erythrozytenmembran ist durch den Parasiten induziert und erhöht die Permeabilität auch für andere essentielle Nährstoffe, darunter auch weitere Vitamine, verschiedene Kohlenhydrate, Aminosäuren und diverse organische oder anorganische Ionen.<sup>94</sup> Sowohl die NPPs als auch die protonenabhängigen Pantothenat-Transporter sind als Targets für antiplasmodiale Wirkstoffe denkbar.



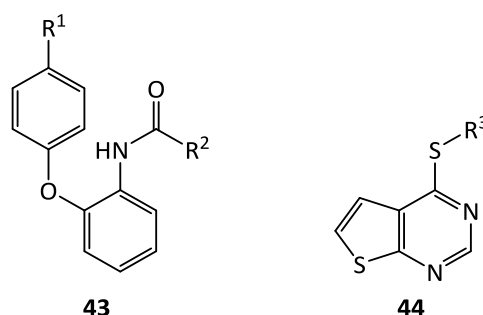
**Abbildung 1-13:** Die Aufnahme von Pantothenat (**37**) durch NPPs in den Erythrozyt und der darauf folgende Transport durch einen H<sup>+</sup>-Pantothenat-Symporter (A) in das parasitäre Cytosol. Dort wird **37** weiter bis zum Dephospho-CoA (**41**) umgesetzt. Schließlich erfolgt die Phosphorylierung zum CoA (**35**) im Apikoplast von *Plasmodium*.<sup>84</sup> Abbildung modifiziert nach SPRY *et al.*<sup>84</sup>

Derivate des Pantothenats wurden schon in den 1940er Jahren als Wachstumsinhibitoren von Plasmodien untersucht.<sup>95</sup> Trotz vielversprechender Ergebnisse wurde die Entwicklung der Substanzklasse jedoch nicht weiterverfolgt.<sup>84</sup> In jüngster Zeit wurden Pantothenamide, bei welchen die Carboxylgruppe durch verschiedenen substituierte Carbonsäureamide ersetzt wurden, mit antibiotischer Aktivität gefunden.<sup>96, 97</sup> Daraufhin ist diese Substanzklasse auch wieder in den Fokus für Untersuchungen an Plasmodien gerückt.<sup>87, 98, 99</sup> Von FLETCHER und AVERY wurde ein Assay entwickelt, bei dem der Einfluss von Inhibitoren auf den CoA-Metabolismus untersucht

werden kann. Der Assay ist auch für Screenings höheren Durchsatzes geeignet und wurde zur Testung der 400 Verbindungen der sogenannten Malaria Box<sup>100</sup>, sowie weiteren 144 Substanzen einer internen Substanzbibliothek verwendet. Dabei wurden verschiedene antiplasmodiale Verbindungen mit unterschiedlichen chemischen Grundstrukturen gefunden, deren Wirkweise sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit dem CoA-Stoffwechsel der Parasiten steht.<sup>90</sup> Diese können einerseits als Ansatzpunkte für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren des plasmodialen CoA-Metabolismus dienen und zum anderen zur genaueren Untersuchung der physiologischen Vorgänge dieses Stoffwechselwegs Verwendung finden.

## 2 Zielsetzung

Wie in Abschnitt 1.3 dargelegt, ist die Anzahl der wirksamen Chemotherapeutika gegen Malaria überschaubar. Zudem sind die vorhandenen Resistenzen eine Bedrohung für die zukünftige Behandlung der Infektion. Deshalb ist es notwendig, neue Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung zu finden, idealerweise mit neuen Wirkmechanismen, um bekannte Resistenzen zu umgehen. Phänotypische Screening-Bibliotheken bieten hierfür eine Reihe von Ansatzpunkten. Verbindungen mit der allgemeinen Struktur eines 2-Phenoxyanilids **43** oder 4-Arylthiothieno[2,3-*d*]pyrimidins **44** (Abbildung 2-1) wurden als Ergebnis von Hochdurchsatzscreenings als Inhibitoren des Wachstums von Plasmodien identifiziert und publiziert.<sup>72, 74</sup> Sie stellen interessante Ausgangsverbindungen für eine Weiterentwicklung dar.

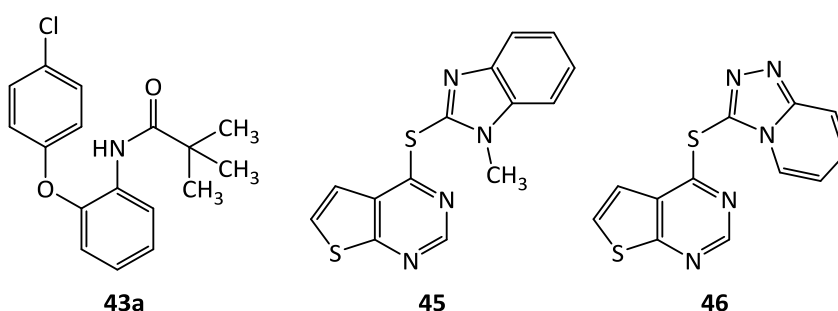


**Abbildung 2-1:** Verallgemeinerte Strukturen literaturbekannter Verbindungen mit antiplasmodialer Aktivität.

Das Phenoxyanilid **43a**, das ursprünglich als Effektor der humanen Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) entwickelt wurde<sup>101</sup>, ist eine Verbindung aus dem TCAMS (s. Abschnitt 1.4.2) mit der Identifikationsnummer TCMDC-137332 (Abbildung 2-2). Es gehört in dieser Kollektion von antiplasmodialen Hit-Strukturen mit einem approximierten IC<sub>50</sub>-Wert von 7 nM bei Untersuchungen gegen *Pf*3D7 zu den potentesten Verbindungen. Zudem wurde eine sehr gute Wachstumshemmung des multiresistenten Erregerstamms *Pf*Dd2 beobachtet, dessen Proliferation bei einer Inhibitorkonzentration von 2 µM um 96% gemindert wurde. Die Toxizität gegenüber HepG2, einer Zelllinie, die vielfach als Indikator für Lebertoxizität verwendet wird<sup>102</sup>, ist jedoch verbesserungswürdig. **43a** zeigte in diesem Assay eine Proliferationshemmung



von 54% bei einer Inhibitorkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ .<sup>72</sup> In einer Folgepublikation von CALDERON *et al.* wurden die Verbindungen des TCAMS mit computergestützten Methoden hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften nach den Regeln von LIPINSKI<sup>103</sup> auf ihr mögliches Potential als Wirkstoffkandidat untersucht. Hierbei ist **43a** als einer von 47 qualitativ hochwertigen Startpunkten für die Wirkstoffentwicklung eines Antimalariamittels ausgewählt worden.<sup>104</sup> **43a** erfüllt die *rule of five* (Ro5) von LIPINSKI, einer Faustregel zur Voraussage für die orale Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen<sup>103</sup>, fast vollständig. Einzig der berechnete Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (clog P) liegt bei 5.11 und damit knapp über der nach LIPINSKI gesetzten Grenze von 5.



**Abbildung 2-2:** Substanzen aus dem TCAMS (**43a** und **45**)<sup>72</sup> sowie aus einer Screening-Kampagne von EDLIN *et al.* (**46**)<sup>74</sup>.

Das Thieno[2,3-*d*]pyrimidinderivat **45** gehört ebenfalls zu der Gruppe vielversprechender Kandidaten des TCAMS. Es ist dort als TCMDC-124514 gelistet.<sup>72, 104</sup> Eine ähnliche Grundstruktur weist auch **46** auf, das aus einem HTS einer Substanzbibliothek des *Medical Research Council Technology* hervorging (Abbildung 2-2).<sup>74</sup> **45** ist ein starker Wachstumshemmer der Plasmodienstämme 3D7 und Dd2, inhibiert jedoch nur in geringem Maße die Proliferation der HepG2-Zelllinie.<sup>72</sup> Die Verbindung ist allerdings relativ lipophil (clog P = 4.27), die physikochemischen Eigenschaften sind also noch optimierbar. Bei einem Proliferationsassay mit *P. falciparum* NF54-Erregern inhibierte **46** das Wachstum der Parasiten halbmaximal bei einer Konzentration von 0.15  $\mu\text{M}$ . Es zeigte eine gute Membranpermeabilität, aber trotz eines clog P von 2.59 nur eine moderate kinetische Löslichkeit von 20  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer (pH 7.4).<sup>74</sup> Neben **45** und **46** sind auch Analogsubstanzen aus den genannten Kampagnen gute Hemmstoffe des Wachstums von Plasmodien. Sowohl den Daten von GAMO *et al.*<sup>72</sup>, als auch jenen von

EDLIN *et al.*<sup>74</sup> konnte entnommen werden, dass Substituenten an 5- oder 6-Position des Thieno[2,3-*d*]pyrimidins die antiplasmodiale Aktivität verringern.

Ziel dieser Arbeit war es, von **43a** sowie von **45** und **46** abgeleitete neue Verbindungen zu synthetisieren, zu charakterisieren und für die biologische Untersuchung an *P. falciparum* bereitzustellen. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse aus der biologischen Evaluierung sollten die Verbindungen weiter optimiert werden und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden. Die Optimierung der Substanzen sollte unter Berücksichtigung von physikochemischen Eigenschaften geschehen. Dabei sollte die Variation des Substitutionsmusters und damit einhergehend die Einführung von polaren Gruppen zur Senkung der Lipophilie beitragen. Aktive Verbindungen sollten zudem durch Überprüfung ihrer thermodynamischen Löslichkeit charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zielstrukturen für die Substanzen mit antiplasmodialer Aktivität vorzuschlagen.

### 3 Synthesen

#### 3.1 2-Phenoxyanilide und davon abgeleitete Strukturen

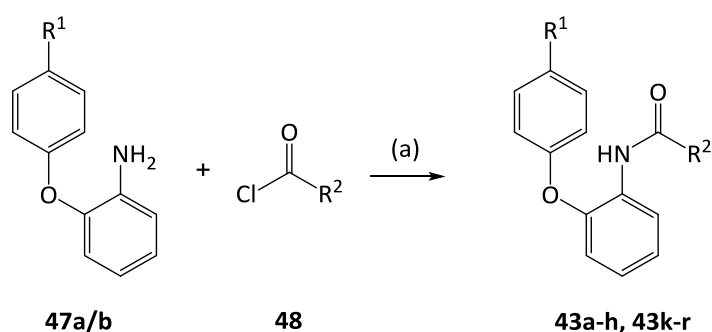
##### 3.1.1 Synthese von 2-Phenoxyaniliden

TCMDC-137332 (**43a**) diene als Ausgangspunkt für die Synthese von Derivaten, die allesamt die Grundstruktur **43** aufweisen. Der *tert*-Butylrest wurde durch einen Methoxyphenylrest und verschiedene aliphatische Reste, die teilweise polare Gruppen enthielten, ersetzt (Tabelle 3-1). Hierdurch sollte die Bedeutung dieser großen lipophilen Seitenkette untersucht werden und durch die Einführung unterschiedlich großer, anders verzweigter, polarer oder aromatischer Reste sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden.

**Tabelle 3-1:** Übersicht der synthetisierten 2-Phenoxyanilide.

ID (R <sup>1</sup> = Cl)	ID (R <sup>1</sup> = OMe)	R <sup>2</sup>	ID (R <sup>1</sup> = Cl)	ID (R <sup>1</sup> = OMe)	R <sup>2</sup>
<b>43a</b>	<b>43k</b>		<b>43f</b>	<b>43p</b>	
<b>43b</b>	<b>43l</b>		<b>43g</b>	<b>43q</b>	
<b>43c</b>	<b>43m</b>		<b>43h</b>	<b>43r</b>	
<b>43d</b>	<b>43n</b>		<b>43i</b>	<b>43s</b>	
<b>43e</b>	<b>43o</b>		<b>43j</b>	<b>43t</b>	

Um die Wirkung von **43a** zu überprüfen, wurde diese Verbindung nachsynthetisiert. **43a** wurde, wie die von ihr abgeleiteten Verbindungen **43b–j**, durch Amidkupplung ausgehend von kommerziell erhältlichem 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (**47a**) hergestellt. Zudem wurde eine zweite Gruppe von Analogsubstanzen synthetisiert, bei welcher der Chlorsubstituent durch einen Methoxysubstituenten ersetzt wurde (**43k–t**). Hier wurde 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin (**47b**) als das kommerziell erhältliche Hydrochlorid als Ausgangsstruktur für die Synthesen eingesetzt. Mit Ausnahme von **43i**, **43j**, **43s** und **43t** wurden alle Verbindungen dieser Serien nach Schema 3-1 über entsprechende Säurechloride **48** mit Triethylamin als Hilfsbase dargestellt. Die gewünschten Testsubstanzen wurden anschließend durch Säulenchromatographie oder Umkristallisation gereinigt und in zufriedenstellenden bis sehr guten Ausbeuten (53–93%) erhalten.

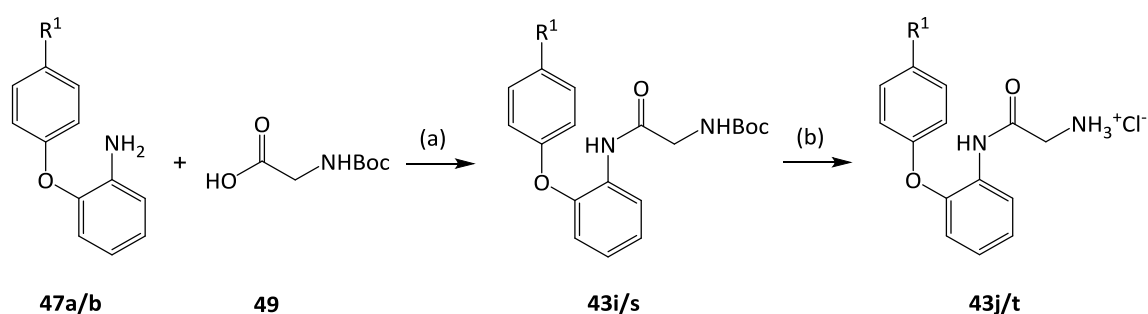


**Schema 3-1:** Synthese von 2-Phenoxyaniliden durch die Reaktion verschiedener Säurechloride **48** mit 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (**47a**) oder 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin (**47b**, eingesetzt als Hydrochlorid): a) Triethylamin, Toluol,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ ;  $\text{R}^1 = \text{Cl}$  (**43a–h**, **47a**),  $\text{R}^1 = \text{OCH}_3$  (**43k–r**, **47b**),  $\text{R}^2$ : siehe Tabelle 3-1.

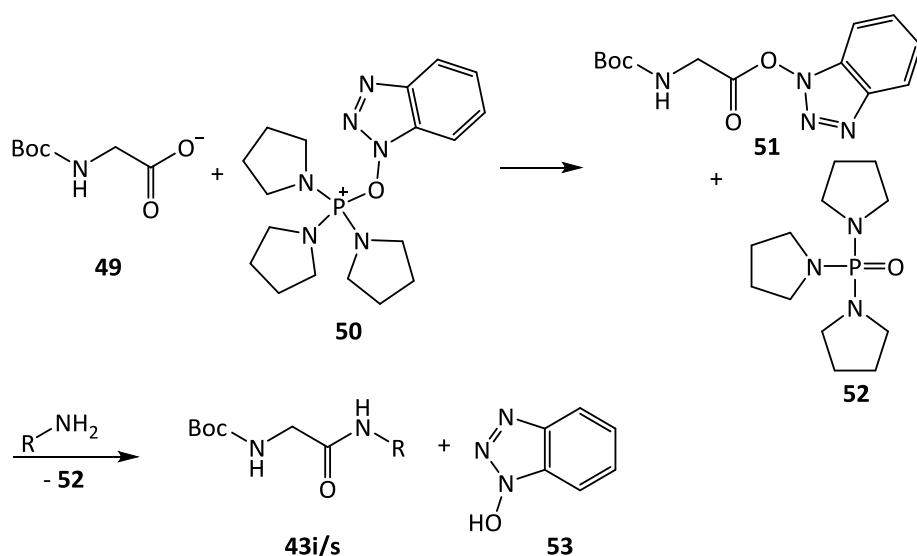
Zur Darstellung von **43b** und **43d** wurden die Reaktionen zusätzlich auch in Pyridin, angelehnt an die Reaktionsbedingungen der Einhorn-Variante der Schotten-Baumann-Reaktion<sup>105</sup>, durchgeführt. Pyridin war hierbei sowohl Base als auch Lösungsmittel. Die Ausbeute der Produkte war auch auf diesem Wege gut, jedoch war die Aufarbeitung der Reaktionslösung unter diesen Bedingungen aufwändiger. Da die Zielstrukturen nicht einfach durch Zugabe von Wasser präzipitierten und das Pyridin im Überschuss vorlag, mussten große Mengen Salzsäure zur Neutralisation verwendet werden. Im Gegensatz hierzu konnte nach der Variante in Schema 3-1, bei der Triethylamin in äquivalenter

Stoffmenge zum Säurechlorid eingesetzt wurde, die Base einfach durch Extraktion als Hydrochlorid abgetrennt werden. Die Synthese von **43a** und **43f** wurde alternativ auch in Tetrahydrofuran (THF) anstelle von Toluol durchgeführt, wobei sich die Ausbeuten nur unwesentlich unterschieden. Die Zielstrukturen konnten hierbei ebenfalls nicht durch Zugabe von Wasser gefällt werden, sodass auch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt werden musste. Toluol wurde für die Synthese der weiteren Testverbindungen als Lösungsmittel bevorzugt, da die wässrige Extraktion des bei der Reaktion entstandenen Salzes direkt aus der Reaktionslösung durchgeführt werden konnte.

Um die Verbindungen **43i** und **43s** zu synthetisieren, wurde *N*-Boc-geschütztes Glycin (**49**) mit dem entsprechenden Anilinderivat **47a** bzw. **47b** in Gegenwart von PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat) als Kupplungsreagenz und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Hilfsbase umgesetzt (Schema 3-2). Zur Aktivierung der reaktionsträgen Carbonsäure **49** wird mit Hilfe von PyBOP (**50**) *in situ* das reaktive Zwischenprodukt **51** gebildet. Dieser aktivierte Ester lässt sich leichter mit Aminen verknüpfen als die freie Carbonsäure, weshalb die entsprechenden Amide in guten Ausbeuten isoliert werden können. Die Bildung des Phosphorsäuretriamids **52** ist eine Triebkraft der Reaktion. Ein weiteres Nebenprodukt ist Hydroxybenzotriazol (**53**), das durch erneute Reaktion mit der Carbonsäure zu **51** wieder in den Reaktionszyklus eingreifen kann (Schema 3-3).<sup>106</sup>



**Schema 3-2:** Synthese der 2-Phenoxyanilide **43i** und **43s** sowie die anschließende Darstellung von **43j** und **43t**: a) PyBOP, DIPEA, DCM, 0 °C → RT; b) 1. TFA, DCM, RT, 2. Salzsäure (37%)/Propan-2-ol (1:1); R<sup>1</sup> = Cl (**43i**, **43j**, **47a**), R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub> (**43s**, **43t**, **47b**).



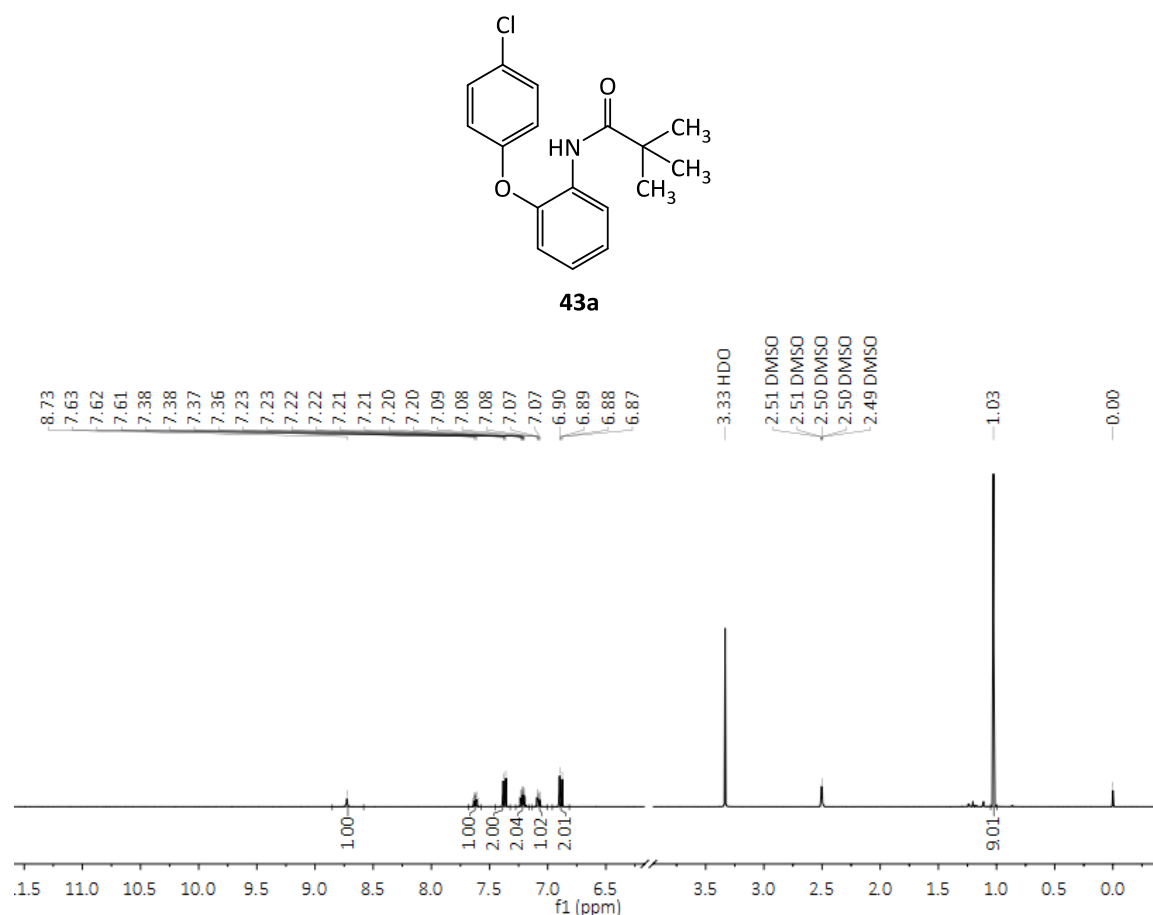
**Schema 3-3:** Eine durch PyBOP vermittelte Amidkupplungsreaktion.

Unter Einsatz von Trifluoressigsäure (TFA) konnten die Boc-Schutzgruppen von **43i** und **43s** abgespalten werden. Um **43j** und **43t** zu isolieren, wurden diese mit Hilfe eines Gemisches aus Propan-2-ol und Salzsäure (37%) als Hydrochloride ausgefällt (Schema 3-2). Durch eine Aufarbeitung von **43j** und **43t** mit Diethylether konnte die nach dem Einengen der Reaktionslösung zurückgebliebene TFA, die in Ether sehr gut löslich ist, abgetrennt werden. Die Hydrochloride wurden in zufriedenstellender (**43j**) bzw. sehr guter Ausbeute (**43t**) erhalten. Mit Hilfe dieser Synthesesequenz wurde in die Zielstrukturen eine basische Seitenkette eingefügt. Die Boc-geschützten Vorstufen (**43i**, **43s**) wurden ebenfalls in ausreichender Reinheit für die biologische Testung bereitgestellt.

### 3.1.2 Analytik der 2-Phenoxyanilide

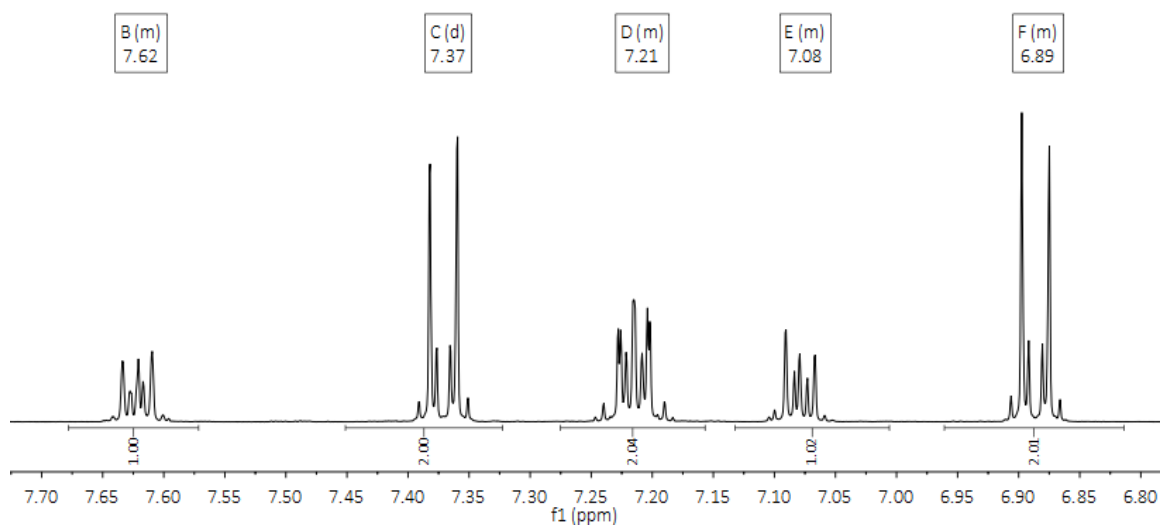
Die Spektren der 2-Phenoxyanilide beinhalten typische Signale für die Strukturelemente der Verbindungen, was am Beispiel von **43a** gut gezeigt werden kann. Das IR-Spektrum enthält bei 3335 cm<sup>-1</sup> eine deutliche Bande für die N-H-Valenzschwingung des Carbonsäureamids, zudem die typische Bande für die Carbonylschwingung bei 1664 cm<sup>-1</sup>. Zudem ist bei **43a** eine deutliche Bande der C-H-Valenzschwingung bei 2967 cm<sup>-1</sup> zu beobachten, die durch die *tert*-Butylgruppe verursacht wird.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **43a** (Abbildung 3-1) ist ebenfalls repräsentativ für die weiteren synthetisierten 2-Phenoxyanilide. Im Hochfeldbereich des Spektrums befindet sich das Singulett-Signal für die neun Protonen der *tert*-Butylgruppe (1.03 ppm), die alle äquivalent sind. Das Signal des Amidprotons ist als breites Singulett bei 8.73 ppm zu sehen. Zwischen 6.8 und 7.7 ppm ergeben sich 5 Multipletts, die die acht aromatischen Protonen repräsentieren.



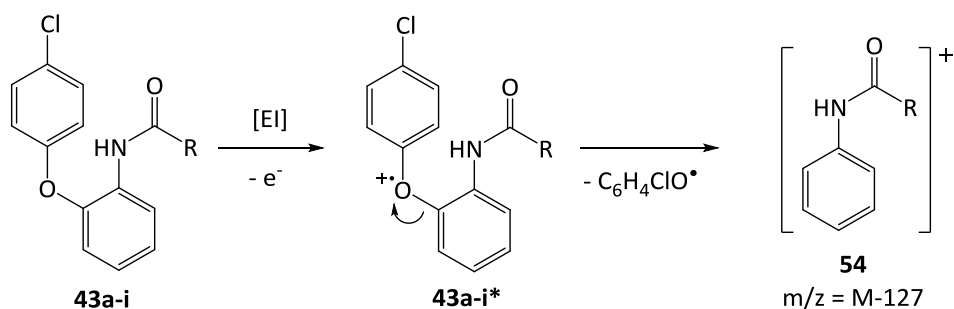
**Abbildung 3-1:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **43a**. Abbildung des gesamten Spektrums (der Bereich zwischen 3.5 und 6.5 ppm enthält keine Signale und wurde zur besseren Übersicht herausgeschnitten). Das Multiplett des Solvens DMSO ist bei der erwarteten Verschiebung zu finden (2.49–2.51 ppm), ebenso wie das Signal von einfach deuteriertem Wasser (3.33 ppm).

In der Vergrößerung des aromatischen Bereichs (Abbildung 3-2) ist der Dacheffekt zwischen dem Multiplett C und dem Multiplett F deutlich zu erkennen. Der Dacheffekt ist ein Hinweis für die Kopplung dieser Signale, die den Protonen des *para*-substituierten Aromaten entsprechen.



**Abbildung 3-2:** Vergrößerte Darstellung des Abschnitts zwischen 6.8 und 7.7 ppm, in dem die aromatischen Signale des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **43a** zu erkennen sind.

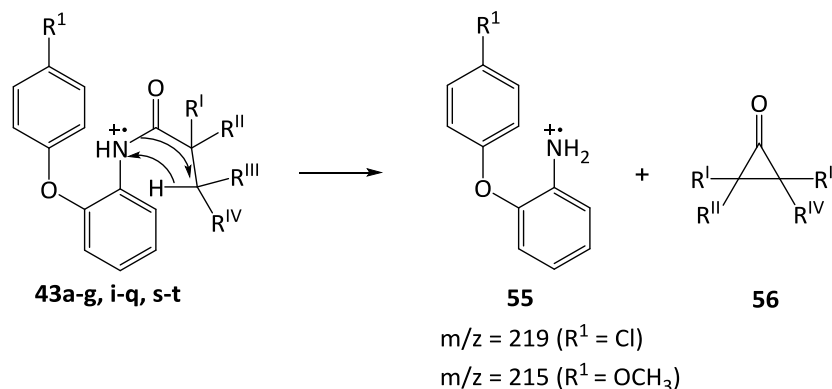
Die 2-Phenoxyanilide zeigen bei der massenspektrometrischen Untersuchung nach der *electron impact*-Methode (EI-MS) häufig gleiche Fragmentierungsmuster. So wird bei den Chlor-substituierten Verbindungen meist ein Fragment mit der Molekülmasse 127u abgespalten, das vermutlich dem Radikal mit der Summenformel  $\text{C}_6\text{H}_4\text{ClO}$  entspricht. Demzufolge ist im Massenspektrum ein Fragmentpeak mit M-127 zu sehen, der in vielen Fällen auch den Basispeak darstellt. Analog wird bei den Methoxy-substituierten Verbindungen ein Fragment mit der Molekülmasse 123u abgespalten. Diese Massenzahlen deuten darauf hin, dass wahrscheinlich der Diarylether gespalten wird und ein positiv geladenes Anilid (**54**) als Fragment detektiert wird (Schema 3-4).



**Schema 3-4:** Mögliche Fragmentierung der 2-Phenoxyanilide durch induktive Spaltung des Diarylethers am Beispiel der Chlor-substituierten Verbindungen.



Zudem tritt bei den Chlor-substituierten Verbindungen, mit Ausnahme von **43h**, immer ein Fragment mit  $m/z = 219$  auf. Bei einigen Vertretern ist dieses Signal auch der Basispeak. Bei den analogen Methoxy-Verbindungen **43k–t** hat das entsprechende Fragment eine Massenzahl von  $m/z = 215$ . Das 4-Methoxybenzamid **43r** bildet analog zu **43h** eine Ausnahme und zeigt ein anderes Fragmentierungsmuster. Die Massenzahlen  $m/z = 219$  bzw.  $m/z = 215$  deuten auf Anilin-Radikalkationen (**55**) als Fragmente hin, wobei die Acylreste, wie von RAMANA *et al.* vorgeschlagen<sup>107</sup>, als Neutralteilchen (**56**) abgespalten werden. Dabei kommt es zur Umlagerung eines Wasserstoffatoms über einen fünfgliedrigen Zyklus. Die Bildung von Anilin-Radikalkationen konnte auch schon für Formanilide oder Acetanilide beobachtet werden, bei welchen die Übergangszustände für den Wasserstofftransfer dann drei- bzw. viergliedrig sein müssen.<sup>108</sup> Zusätzlich tritt bei den Methoxy-Verbindungen **43k–t** auch häufig ein Fragment mit  $m/z = 200$  auf. Eine mögliche Erklärung wäre die Abspaltung eines Methylradikals ( $M = 15u$ ) aus **55** ( $R^1 = OCH_3$ ), welche bei Verbindungen mit Methoxygruppe typisch ist.

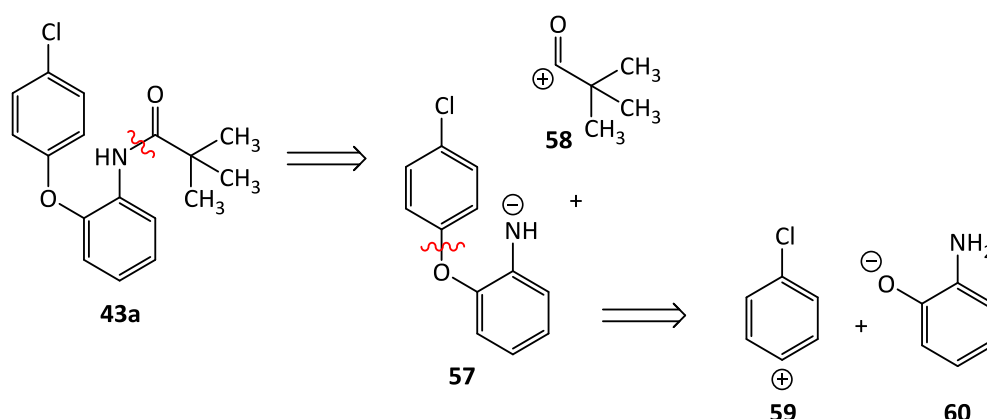


**Schema 3-5:** Mögliche Bildung eines Anilin-Radikalkations (**55**) als Fragment in der EI-MS-Untersuchung von **43a–t**.<sup>107, 108</sup>  $R^I, R^{II}, R^{III}, R^{IV}$ : H, Alkyl.

### 3.1.3 Synthese von 2,2-Dimethyl-1-(10H-phenoxazin-10-yl)propan-1-on

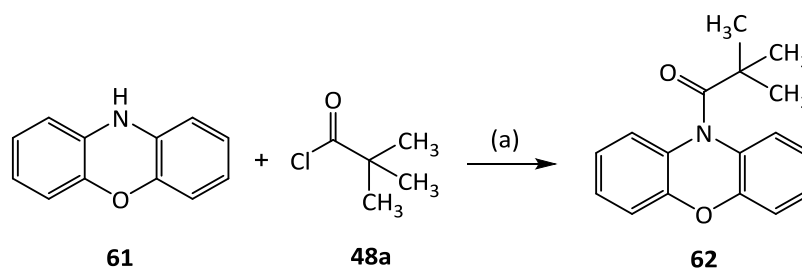
Neben den 2-Phenoxyaniliden wurde auch eine trizyklische Variante synthetisiert. Im HTS von GAMO *et al.* war TCMDC-137332 (**43a**) eine der vielversprechendsten Verbindungen. Die Testung einer speziell zu diesem Zweck nachsynthetisierten Substanz dieser Konstitution ergab jedoch nur marginale antiplasmodiale Aktivität (siehe

Abschnitt 5.1). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch besteht darin, dass es sich bei der aktiven Spezies, die die Inhibition im Rahmen des TCAMS verursachte, um eine Verunreinigung handelte. Aus der Retrosynthese von **43a** geht durch das Synthon **60** hervor, dass vermutlich 2-Aminophenol eine der Ausgangsverbindungen des Synthesewegs ist (Schema 3-6).



**Schema 3-6:** Retrosynthese des 2-Phenoxyanilids **43a**.

Als mögliche Nebenprodukte aus dieser Syntheseroute kommen deshalb vom Phenoxazin abgeleitete Strukturen in Frage. Unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise durch Mikrowellensynthese unter Anwesenheit von Säuren, kann aus zwei Molekülen 2-Aminophenol Phenoxazin (**61**) gebildet werden.<sup>109</sup> Wurde dieses im Rahmen der Synthese von **43a** nicht komplett abgetrennt, hätte es nachfolgend mit Pivaloylchlorid (**48a**) im Sinne einer Amidkupplung reagieren können. Deshalb wurde das entsprechende Phenoxazinderivat (**62**) synthetisiert (Schema 3-7) und für die biologische Evaluierung verfügbar gemacht.



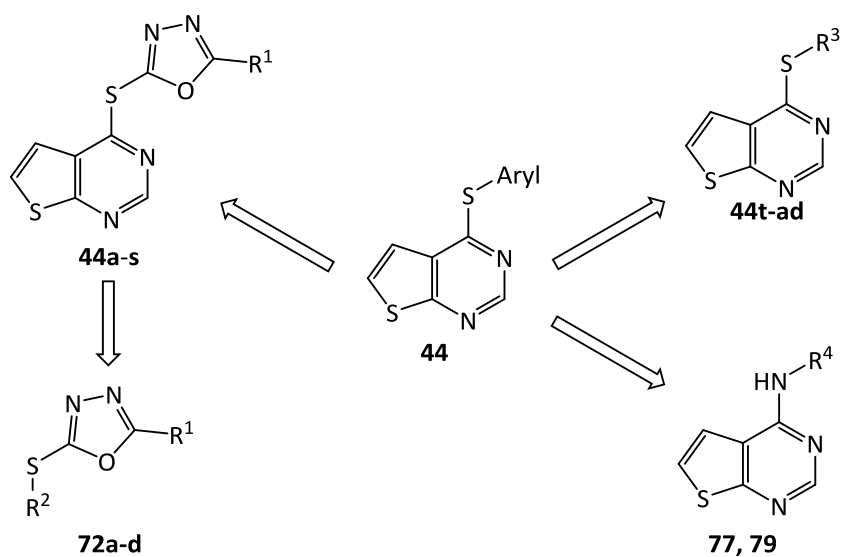
**Schema 3-7:** Synthese von 2,2-Dimethyl-1-(10H-phenoxazin-10-yl)propan-1-on (**62**). Reaktionsbedingungen: (a) NaH, DMF, Stickstoffatmosphäre, 0 °C → RT.

## 3.2 Diarylthioether und davon abgeleitete Strukturen

### 3.2.1 Struktur-Design der Testverbindungen

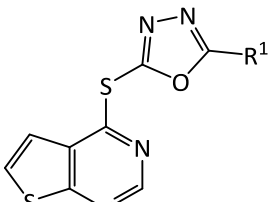
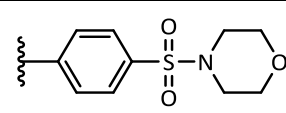
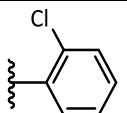
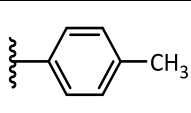
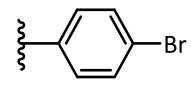
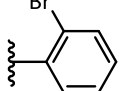
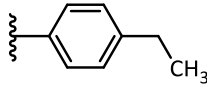
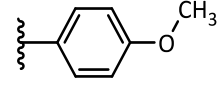
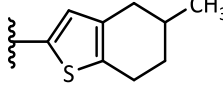
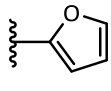
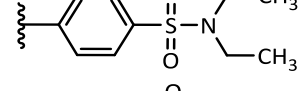
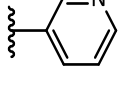
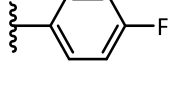
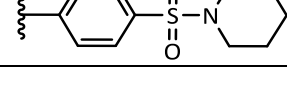
In Anlehnung an **46** wurden zunächst Verbindungen untersucht, bei welchen die 1,2,4-Triazolteilstruktur durch verschieden substituierte 1,3,4-Oxadiazole ersetzt wurden. Die 1,3,4-Oxadiazolteilstruktur ist ein interessanter Baustein für Wirkstoffe. Verschiedene Übersichtsartikel zeigen, dass dieses Strukturelement ein breites Anwendungsspektrum besitzt und vielfältige biologische Aktivitäten mit einer 1,3,4-Oxadiazolteilstruktur in Verbindung gebracht werden.<sup>110–113</sup> Es wird zudem als Bioisoster für Amide oder Ester betrachtet. Verbindungen mit 1,3,4-Oxadiazolteilstruktur sind metabolisch stabiler und weniger lipophil als isomere Substanzen mit 1,2,4-Oxadiazol-Teilstruktur.<sup>112</sup>

Mit Hilfe einer Datenbank-Recherche (CAS-Datenbank, Benutzeroberfläche SciFinder) wurden Testverbindungen gesucht, die die allgemeine Struktur **44** aufwiesen und eine 1,3,4-Oxadiazol-Teilstruktur enthielten. Das Thieno[2,3-*d*]pyrimidin sollte dabei mit Ausnahme der Position 4 unsubstituiert sein. Ein weiteres Filterkriterium war die Verfügbarkeit der Substanz in ausreichender Reinheit ( $\geq 95\%$ ) und Menge (10 mg) bei einem europäischen Händler. Es wurden daraufhin dreizehn kommerziell verfügbare Testverbindungen erworben (**44a–m**), die aromatische Reste in 5-Position des 1,3,4-Oxadiazols enthielten (Tabelle 3-2). Zur Erweiterung dieser Reihe wurden Verbindungen mit aliphatischen Substituenten in 5-Position synthetisiert (**44n–s**). Gestützt durch die biologischen Ergebnisse der ersten Substanzgruppe (**44a–s**), wobei vor allem **44l** bei einem Screening als Inhibitor der Plasmodien-Proliferation hervortrat, sollte des Weiteren die Relevanz der Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Teilstruktur untersucht werden. Deshalb wurde diese auch durch andere Heterozyklen ersetzt (**72a–d**). Zudem wurden bei den Diarylthioethern **44t–ad** zur weiteren Variation der Verbindungen diverse Heteroaromaten anstelle des 1,3,4-Oxadiazols eingeführt. Schließlich wurden noch zwei Substanzen mit einer Diarylamin-Grundstruktur dargestellt (**77**, **79**) wodurch die Bedeutung der Thioether-Teilstruktur untersucht werden sollte.



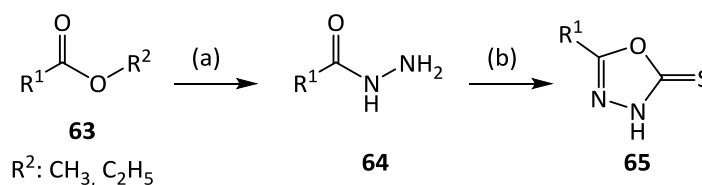
**Schema 3-8:** Arbeitsschema zur Darstellung verschiedener Diarylthioether und einiger Diarylamine. **44a–m**:  $R^1$  = Aryl (s. Tabelle 3-2); **44n–s**:  $R^1$  = Alkyl (s. Tabelle 3-5); **44t–ad**:  $R^3$  = Hetaryl (s. Tabelle 3-7); **72a–d**:  $R^1$  = Furan-2-yl, *tert*-Butyl,  $R^2$  = Hetaryl (s. Tabelle 3-6); **77**:  $R^4$  = Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl; **79**:  $R^4$  = 5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl.

**Tabelle 3-2:** Übersicht der kommerziell erworbenen Testverbindungen **44a–m**.

					
ID	$R^1$	ID	$R^1$	ID	$R^1$
<b>44a</b>		<b>44f</b>		<b>44j</b>	
<b>44b</b>		<b>44g</b>		<b>44k</b>	
<b>44c</b>		<b>44h</b>		<b>44l</b>	
<b>44d</b>		<b>44i</b>		<b>44m</b>	
<b>44e</b>					

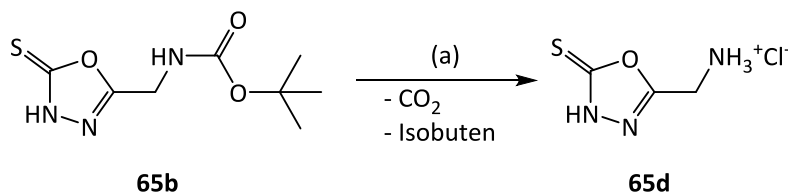
### 3.2.2 Synthese von 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen

Die Darstellung von 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen (**65**, Tabelle 3-3) erfolgte durch eine Zyklisierungsreaktion, in Anlehnung an eine Vorschrift von JANSEN *et al.*, ausgehend von Carbonsäurehydraziden **64** mit Kohlenstoffdisulfid unter Einfluss von Kaliumhydroxid (Schema 3-9).<sup>114</sup> Die Reaktionen wurden unter Rückfluss durchgeführt, da bei 10 °C anstelle von 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen möglicherweise 1,3,4-Thiadiazol-2(3H)-thione gebildet werden können.<sup>115</sup> Die benötigten Carbonsäurehydrazide wurden durch die Reaktion von entsprechenden Carbonsäureestern **63** mit überschüssigem Hydrazinhydrat gewonnen (Schema 3-9). Die Synthese erfolgte entweder in Methanol als Lösungsmittel oder ausschließlich mit der wässrigen Hydrazinlösung (64%).<sup>114, 116</sup> Das zur Synthese von **65g** verwendete Hydrazid wurde kommerziell erworben.



**Schema 3-9:** Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung von 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen **65** über die entsprechenden Hydrazide **64**: (a) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (64%), H<sub>2</sub>O oder H<sub>2</sub>O/MeOH, 6–24 h, Reflux; (b) CS<sub>2</sub>, KOH, EtOH, 6.5–24 h, Reflux.

Bei den Substanzen mit geschützter Aminogruppe (**65a**, **65b**) wurden durch Einleitung von Chlorwasserstoffgas in eine etherische Lösung die Boc-Gruppen abgespalten und so die Verbindungen **65c** und **65d** als Hydrochloride ausgefällt (Schema 3-10).

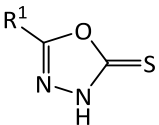
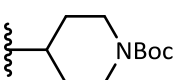
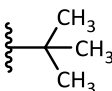
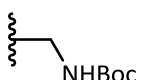

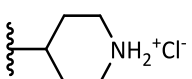
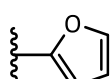
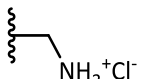


**Schema 3-10:** Abspaltung der Boc-Gruppe am Beispiel der Darstellung von **65d** aus **65b**: a) HCl<sub>(g)</sub>, Diethylether/MeOH, 0 °C → RT.<sup>114</sup>

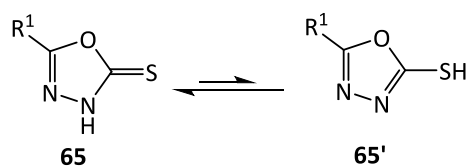
Die sauer katalysierte Spaltung erfolgt zunächst unter Bildung eines *tert*-Butylkations. Dieses kann durch Eliminierung eines Protons zu Isobuten weiterreagieren. Nachfolgend

entsteht durch die Eliminierung von Kohlenstoffdioxid aus der Carbamidsäure die freie Aminogruppe, die sofort durch Chlorwasserstoff protoniert wird. Alle in dieser Arbeit synthetisierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

**Tabelle 3-3:** Synthetisierte Verbindungen der allgemeinen Struktur **65**.

			
ID	R¹	ID	R¹
<b>65a</b>		<b>65e</b>	
<b>65b</b>		<b>65f</b>	
<b>65c</b>		<b>65g</b>	
<b>65d</b>			

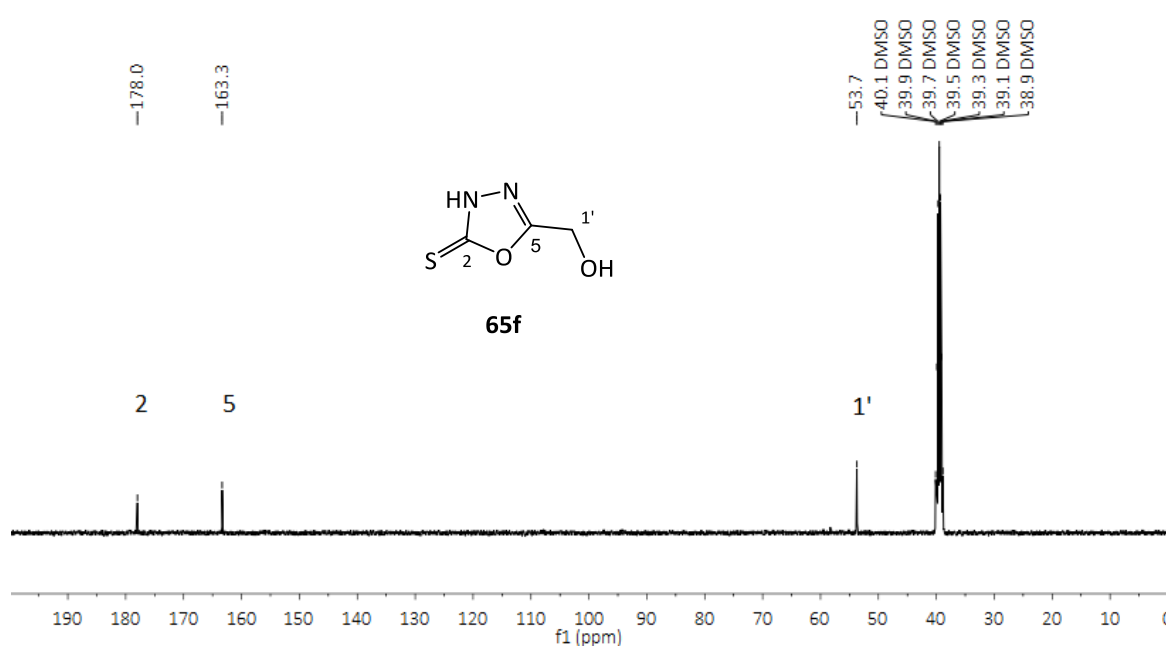
Die Verbindungen mit der allgemeinen Struktur **65** liegen in einem Tautomerengleichgewicht vor (Schema 3-11), wobei die Thion-Form **65** gegenüber der Thiol-Form **65'** sowohl beim Feststoff als auch in der Lösung überwiegt.<sup>117</sup>



**Schema 3-11:** Gleichgewicht zwischen der 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion-Form **65** und der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiol-Form **65'**.

Das für alle synthetisierten Oxadiazole repräsentative Beispiel eines NMR-Spektrums von **65f** unterstützt die These, dass hauptsächlich die Thionform vorliegt. Neben einem breiten, weit ins tiefe Feld verschobenen Signal im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, das wahrscheinlich durch das Proton am Stickstoff in Position 3 des 1,3,4-Oxadiazols

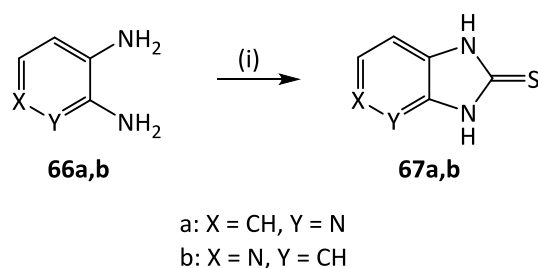
verursacht wird, ist vor allem das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 3-3) aussagekräftig. Wie viele Beispiele der Literatur zeigen, verursacht der Thiocarbonylkohlenstoff im Allgemeinen ein Signal, das deutlich über 170 ppm liegt.<sup>114, 117–119</sup> Im konkreten Fall von **65f** liegt dieses bei 178.0 ppm (2). Eine derartige Tieffeldverschiebung wäre bei **65'** nicht zu erwarten.<sup>118</sup> Die weiteren Signale des Spektrums können dem C5 des Oxadiazols (163.3 ppm) und dem aliphatischen Kohlenstoff des Hydroxymethylrests (1', 53.7 ppm) zugeordnet werden.



**Abbildung 3-3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **65f** als Beispiel für ein 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion. Das Spektrum wurde in deuteriertem DMSO aufgenommen, dessen Signale zwischen 38.9 und 40.1 ppm zu sehen sind. Die Nummerierung der Atome dient ausschließlich der Zuordnung der Signale und orientiert sich nicht an den IUPAC-Regeln.

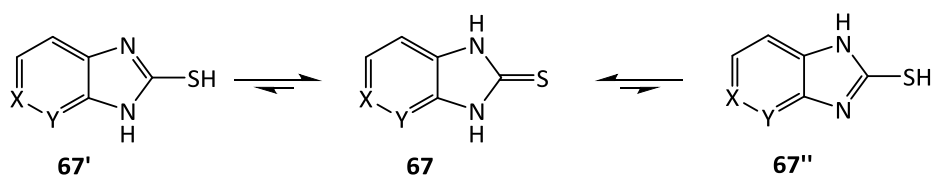
### 3.2.3 Synthese von Imidazopyridinthionen

Die Synthese der Imidazopyridinthione **67a** und **67b** erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von CHANG *et al.*<sup>120</sup> Dabei wurden Diaminopyridine **66** unter ähnlichen Bedingungen wie die Hydrazide **64** mit Kohlenstoffdisulfid in Ethanol unter Einfluss von Kaliumhydroxid umgesetzt. Auf diese Weise konnte **67b** in sehr guter Ausbeute (96%), **67a** jedoch nur mit 32% Ausbeute isoliert werden.



**Schema 3-12:** Synthese von 1*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67a**) und 1*H*-Imidazo[4,5-*c*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67b**) aus 2,3-Diaminopyridin (**66a**) bzw. 3,4-Diaminopyridin (**66b**): i) CS<sub>2</sub>, KOH, EtOH (90%), RT → 78 °C, 5 h.

Ähnlich wie die Oxadiazolthione (siehe Schema 3-11) liegen auch die Imidazopyridinthione in einem Gleichgewicht zwischen der Thion- und der Thiol-Form vor, wobei hierbei die Bildung des Imins über beide Stickstoffe des Imidazolrings möglich ist (Schema 3-13).



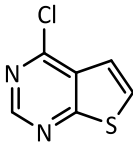
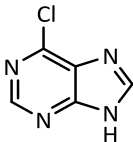
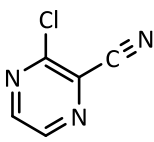
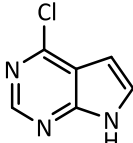
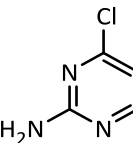
**Schema 3-13:** Tautomerisierung der Imidazopyridinthione **67**. X, Y: CH, N (s. Schema 3-12).



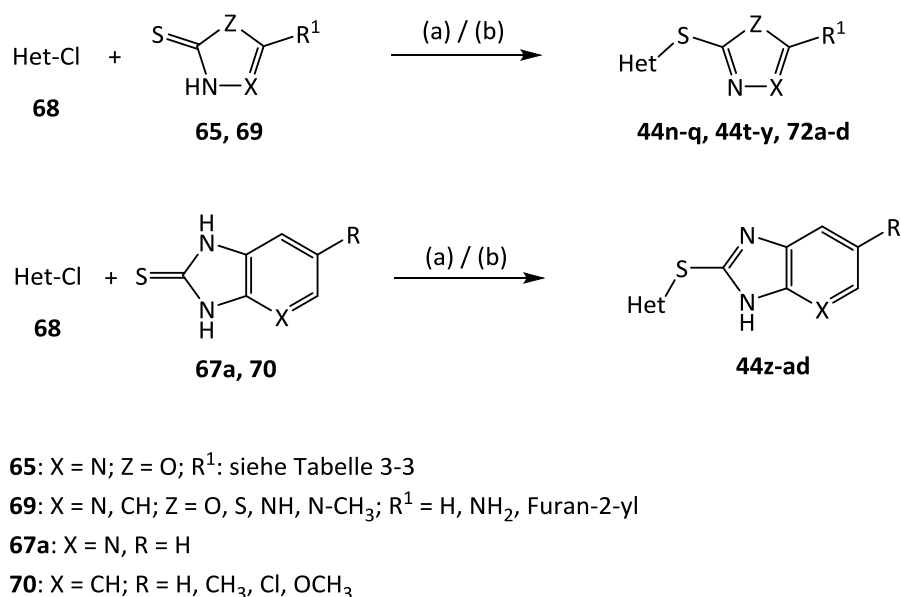
### 3.2.4 Synthese von Diarylthioethern als Testverbindungen

Die Synthese der Diarylthioether erfolgte ausgehend von Nucleophilen, wie den 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thionen **65**, Imidazopyridinthionen **67** oder anderen heterozyklischen Thionverbindungen, die mit kommerziell erworbenen elektronenarmen Heteroaromaten (**68a–e**, Tabelle 3-4) umgesetzt wurden. Die Reaktionen verliefen wahrscheinlich nach dem Schema einer nucleophilen aromatischen Substitution mit Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Die Heteroaromaten **68** enthielten mit Ausnahme von **68e** alle eine Pyrimidin-Teilstruktur und einen Chlorsubstituenten am C4 des Pyrimidinrings. Dieses Kohlenstoffatom ist aufgrund der Position der Stickstoffatome im Heteroaromaten und dem Elektronenzug des Chlorsubstituenten elektrophil. Zudem ist Chlorid eine gute Abgangsgruppe, weshalb diese Position für nucleophile Angriffe begünstigt ist. Die Reaktionen wurden unter basischen Bedingungen in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. DMF, Propan-2-ol) durchgeführt. Als Base wurde meist Triethylamin zugesetzt. Im basischen Milieu sollten die Thione tautomerisieren und zum Thiolat reagieren. Das Thiolat ist stärker nucleophil als das entsprechende Thiol oder Thion und ist deshalb die bevorzugte Spezies für einen nucleophilen Angriff am elektronenarmen Heteroaromaten.

**Tabelle 3-4:** Übersicht der elektronenarmen Heteroaromaten **68** (Het-Cl), die zur Synthese der Diarylthioether verwendet wurden.

ID	Het-Cl	ID	Het-Cl	ID	Het-Cl
<b>68a</b>		<b>68c</b>		<b>68e</b>	
<b>68b</b>		<b>68d</b>			

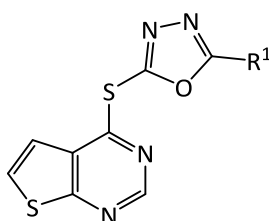
Die Synthese der Testverbindungen **44n–ad** erfolgte mit Ausnahme von **44r** und **44s**, die aus den Testverbindungen **44n** und **44o** hervorgingen, nach dem eben beschriebenen Prinzip. Die Reaktionsbedingungen mussten jedoch aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Nucleophilie der Edukte in Einzelfällen angepasst werden. Grundsätzlich konnte die Darstellung der Testverbindungen durch zwei mögliche Herangehensweisen erfolgen (Schema 3-14, a oder b). Ein Großteil der Reaktionen wurde unter Eintrag von Mikrowellenstrahlung in einer Synthesemikrowelle mit Reaktionszeiten von 20–150 min durchgeführt (a). Einige der Verbindungen wurden auch durch konventionelles Erhitzen auf dem Ölbad synthetisiert, wobei die Reaktionszeiten mit bis zu 48 h deutlich länger waren (b). Die gewünschten Zielverbindungen konnten durch anschließende Reinigung per Säulenchromatographie und/oder durch Umkristallisation in reiner Form isoliert werden.



**Schema 3-14:** Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung der Testverbindungen **44n–q**, **44t–ad** und **72a–d** durch die Reaktion von elektronenarmen Heteroaromaten **68** (Het-Cl, siehe Tabelle 3-4) mit 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen **65**, weiteren heteroaromatischen Fünfring-Thionverbindungen (**69**), dem Imidazopyridinethion **67a** oder verschiedenen substituierten 1H-Benzimidazol-2(3H)-thionen (**70**): (a) Base (z. B. Triethylamin), Lösungsmittel (z.B. DMF), 100–140 °C, MW, 20–150 min; (b) Base (z. B. Triethylamin), Lösungsmittel (z.B. DMF), 83–120 °C, 24–48 h.

Bei der ersten Substanzgruppe (**44n–s**) wurde 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) als elektronenarmer Heteroaromat eingesetzt (Tabelle 3-5). Die gewünschten Zielverbindungen konnten nur in mäßigen Ausbeuten (13–50%) isoliert werden.

**Tabelle 3-5:** Übersicht der synthetisierten Testverbindungen **44n–s**, bei welchen stets 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) als Edukt eingesetzt wurde. MW: Mikrowellensynthese, K: konventionelle Heizmethode.

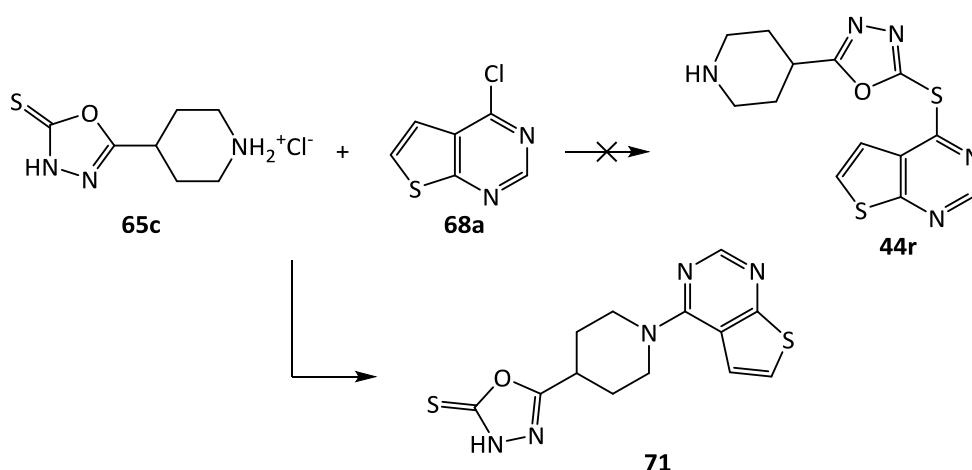


ID	R <sup>1</sup>	Methode	Ausbeute
<b>44n</b>		MW	50%
<b>44o</b>		MW	38%
<b>44p</b>		MW/K	38%/15%
<b>44q</b>		MW	13%
<b>44r</b>		- <sup>a</sup>	37%
<b>44s</b>		- <sup>b</sup>	27%

<sup>a</sup> **44r** wurde aus **44n** durch saure Hydrolyse der Boc-Gruppe synthetisiert. <sup>b</sup> **44s** wurde aus **44o** durch saure Hydrolyse der Boc-Gruppe synthetisiert

Die Boc-Gruppen von **44n** und **44o** wurden mit Hilfe von Trifluoressigsäure abgespalten. Durch Behandlung mit wenigen Tropfen eines 1:1-Gemisches aus Propan-2-ol und Salzsäure (37%) wurden anschließend die Amine **44r** und **44s** als Hydrochloride ausgefällt. Es wurde ebenfalls versucht, analog zur Synthese der Oxadiazole **65c** und **65d**, die Schutzgruppen durch Einleitung von Chlorwasserstoffgas in eine etherische

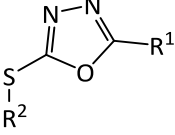
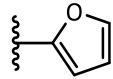
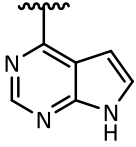
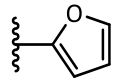
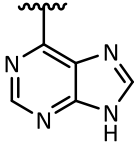
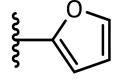
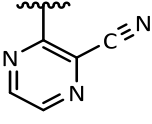
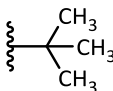
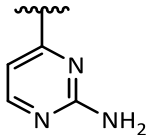
Lösung von **44n** und **44o** abzuspalten. Hierbei entstanden jedoch sehr viele Nebenprodukte, sodass die gewünschten Zielstrukturen nicht isoliert werden konnten. Als weitere alternative Methode zur Darstellung von **44r** und **44s** wurde die Synthese nach Schema 3-14 mit den bereits Boc-entschützten Oxadiazolen **65c** und **65d** geprüft. Jedoch konnten auch hiermit **44r** und **44s** nicht synthetisiert werden. Bei der Reaktion von **65c** mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) entstand hingegen das tertiäre Amin **71** (Schema 3-15), das in ausreichender Reinheit und Menge isoliert und für die biologische Testung bereitgestellt wurde. Die aliphatischen Amin-Teilstrukturen von **65c** und **65d** sind im basischen Milieu nucleophil und konkurrieren mit dem Thiolat um die elektrophile Position im Heteroaromaten. Das entsprechende Produkt aus der Reaktion von **65d** mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin konnte nicht isoliert werden.



**Schema 3-15:** Bei der Reaktion von **65c** mit **68a** konnte nicht der Diarylthioether **44r** isoliert werden. Es entstand das tertiäre Amin **71**.

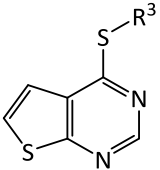
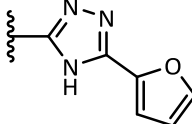
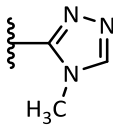
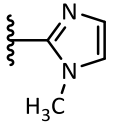
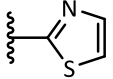
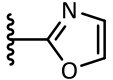
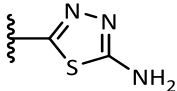
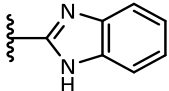
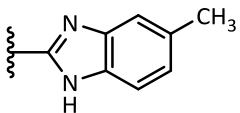
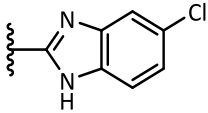
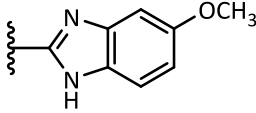
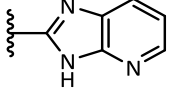
Bei der zweiten Substanzgruppe (**72a–d**, Tabelle 3-6), die ebenfalls nach Schema 3-14 synthetisiert wurde, wurden alternativ zu **68a** andere elektronenarme Heteroaromaten eingesetzt. Die gewünschten Zielverbindungen konnten mit Ausnahme von **72d** in moderaten Ausbeuten (50–67%) erhalten werden.

**Tabelle 3-6:** Übersicht der synthetisierten Testverbindungen **72a–d**. MW: Mikrowellensynthese.

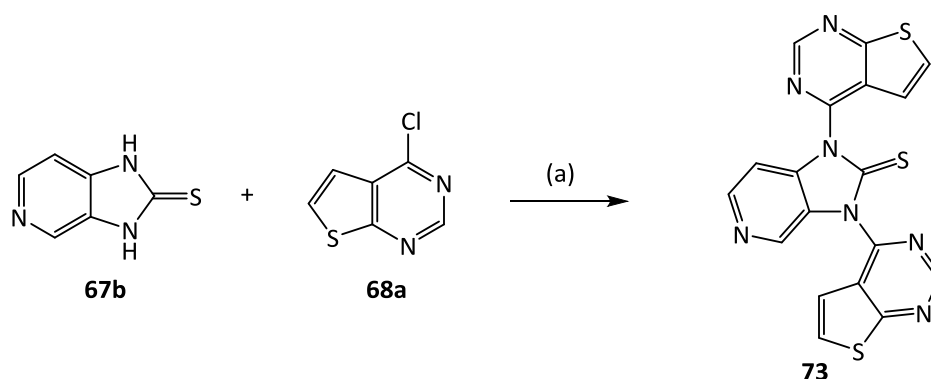
				
ID	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Methode	Ausbeute
<b>72a</b>			MW	67%
<b>72b</b>			MW	52%
<b>72c</b>			MW	52%
<b>72d</b>			MW	20%

Als Ersatz für die 1,3,4-Oxadiazol-Teilstruktur wurden auch andere, meist kommerziell erhältliche Heteroaromaten nach Schema 3-14 mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin umgesetzt (Tabelle 3-7). Aufgrund des guten biologischen Resultats von **44z** wurden auch dessen Derivate **44aa–ad** synthetisiert. Mit Ausnahme von **44t** und **44w** konnten die Verbindungen dieser Gruppe nur mit geringer Ausbeute isoliert werden. Vor allem die vom Benzimidazol abgeleiteten Thione waren sehr reaktionsträge. Die Kombination des für gewöhnlich eingesetzten Lösungsmittels DMF und der Base Triethylamin führte nicht immer zum erfolgreichen Produktumsatz. Um die gewünschten Zielverbindungen zu erhalten, wurden deshalb auch andere Basen, wie Diisopropylethylamin oder das in DMF und DMSO gut lösliche Caesiumcarbonat eingesetzt. Als Lösungsmittel wurden neben DMF auch DMSO und Propan-2-ol verwendet.

**Tabelle 3-7:** Übersicht der synthetisierten Testverbindungen **44t–ad**. MW: Mikrowelle, K: konventionelles Erhitzen.

			
ID	R <sup>3</sup>	Methode	Ausbeute
<b>44t</b>		MW	72%
<b>44u</b>		MW	15%
<b>44v</b>		K	32%
<b>44w</b>		MW	72%
<b>44x</b>		MW	21%
<b>44y</b>		K	36%
<b>44z</b>		K	18%
<b>44aa</b>		MW	29%
<b>44ab</b>		MW	28%
<b>44ac</b>		MW	11%
<b>44ad</b>		K	11%

Aus 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) und Imidazo[4,3-*c*]pyridin-2-thion (**67b**) (Schema 3-12) konnte die zu **44ad** analoge Zielstruktur nicht hergestellt werden. Aus dem Reaktionsansatz konnte jedoch das Produkt der Reaktion von zwei Äquivalenten 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin mit **67b** isoliert werden, das vermutlich die Struktur **73** aufweist (Schema 3-16). Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung traten die für den Thieno[2,3-*d*]pyrimidinring typischen Signale (siehe Abschnitt 3.2.5.1) im Verhältnis zu den Signalen des Imidazo[4,3-*c*]pyridinrings mit doppelter Intensität auf. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **73** sind zudem 18 Kohlenstoffsignale zu erkennen, was zusätzlich auf die in Schema 3-16 dargestellte Struktur hindeutet. Hierbei handelt es sich um eine Nebenreaktion, die möglicherweise auch die geringen Ausbeuten der Synthesen von **44ad** und der Benzimidazole **44z–ac** erklären könnte, da die beschriebene Nebenreaktion zu **73** auch bei diesen Reaktionen stattfinden konnte.



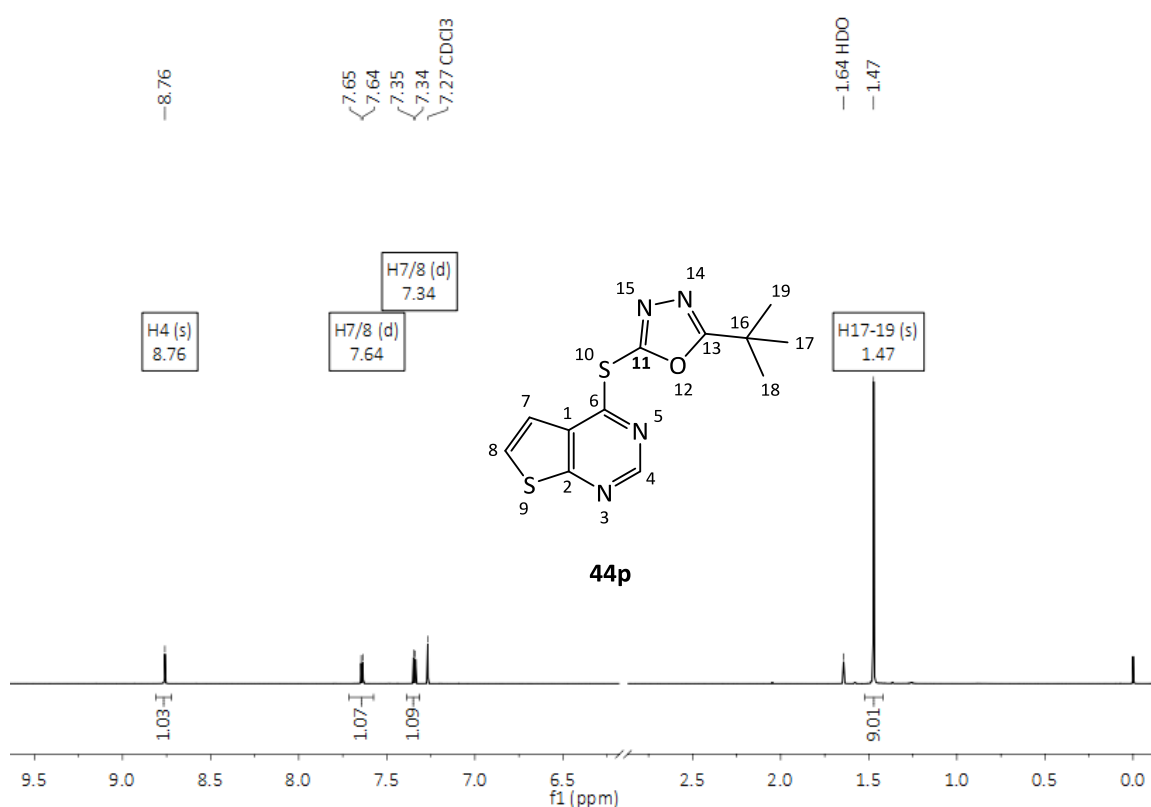
**Schema 3-16:** Reaktion von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) mit 1H-Imidazo[4,5-*c*]pyridin-2(3H)-thion (**67b**). (a) Triethylamin, DMF, 1. 120 °C, MW, 30 min, 2. 75 °C, 48 h.

### 3.2.5 Analytik der Diarylthioether

#### 3.2.5.1 Spektroskopische Besonderheiten der Testverbindungen mit 2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Struktur

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44p** (Abbildung 3-4) sind typische Elemente enthalten, die auch bei den weiteren Testverbindungen mit 2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Struktur vorhanden und einfach zu identifizieren sind. Die Protonensignale der Thieno[2,3-*d*]pyrimidinstruktur haben stets jeweils eine ähnliche chemische Verschiebung. Das Singulett des Pyrimidinprotons (H-4) erscheint für gewöhnlich bei

etwa 8.8 ppm. Im Fall von **44p** liegt die chemische Verschiebung bei 8.76 ppm. Die Dubletts der Thiophenprotonen sind aufgrund ihres Dacheffekts und der typischen Kopplungskonstante von 6 Hz ebenfalls gut zu identifizieren. Die chemische Verschiebung der Dubletts von **44p** liegt bei 7.34 und 7.64 ppm. Des Weiteren enthält das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44p** ein deutliches Singulett bei 1.47 ppm für die Protonen der *tert*-Butylgruppe.



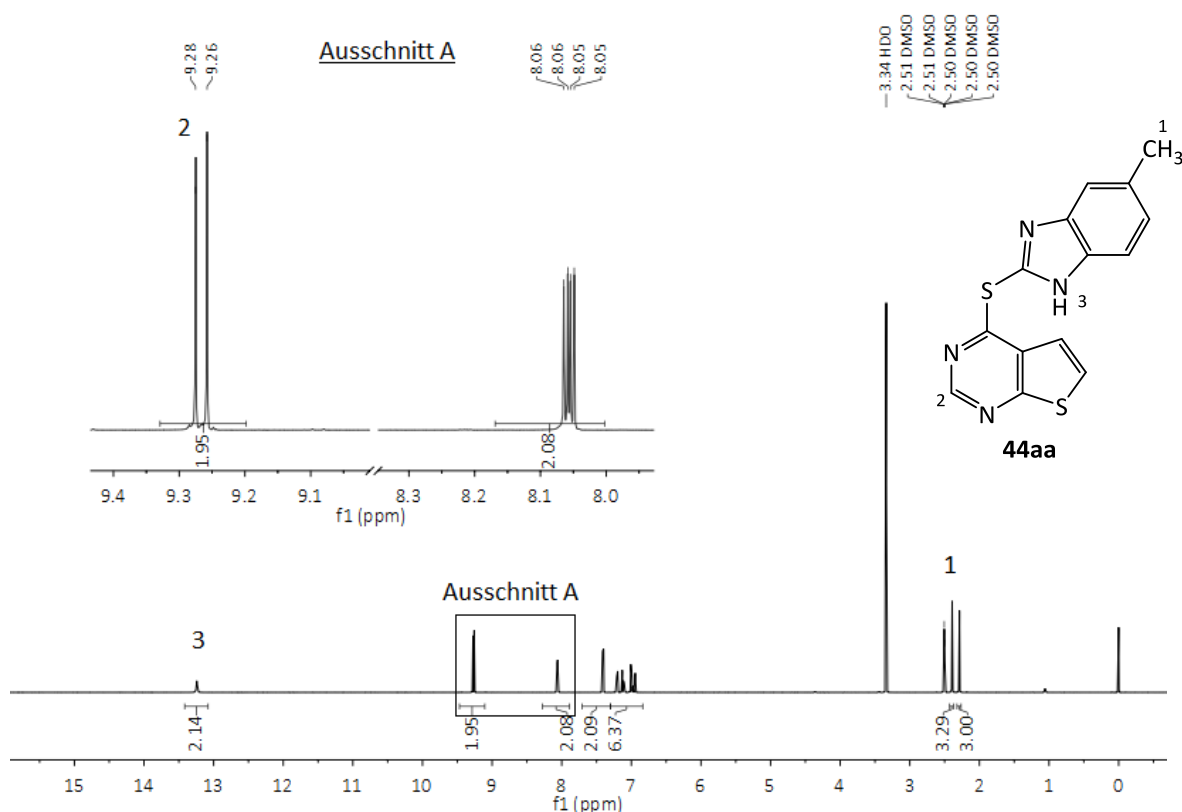
**Abbildung 3-4:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44p** mit Zuordnung der Signale. Das Spektrum wurde in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen, dessen Signal bei 7.34 ppm zu sehen ist. Das Singulett von einfach deuteriertem Wasser erscheint bei 1.64 ppm. Die Nummerierung der Atome dient nur der Zuordnung der Signale und folgt nicht den IUPAC-Regeln.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Testverbindungen, die anstelle der 1,3,4-Oxadiazol-Teilstruktur andere Heteroaromaten enthalten, zeigen ein identisches Muster für die Signale der Thieno[2,3-*d*]pyrimidinstruktur, die chemische Verschiebung der Signale weicht jedoch etwas ab. Die typische Kopplungskonstante der Thiophenprotonen von 6 Hz wird aber auch bei diesen Verbindungen beobachtet.





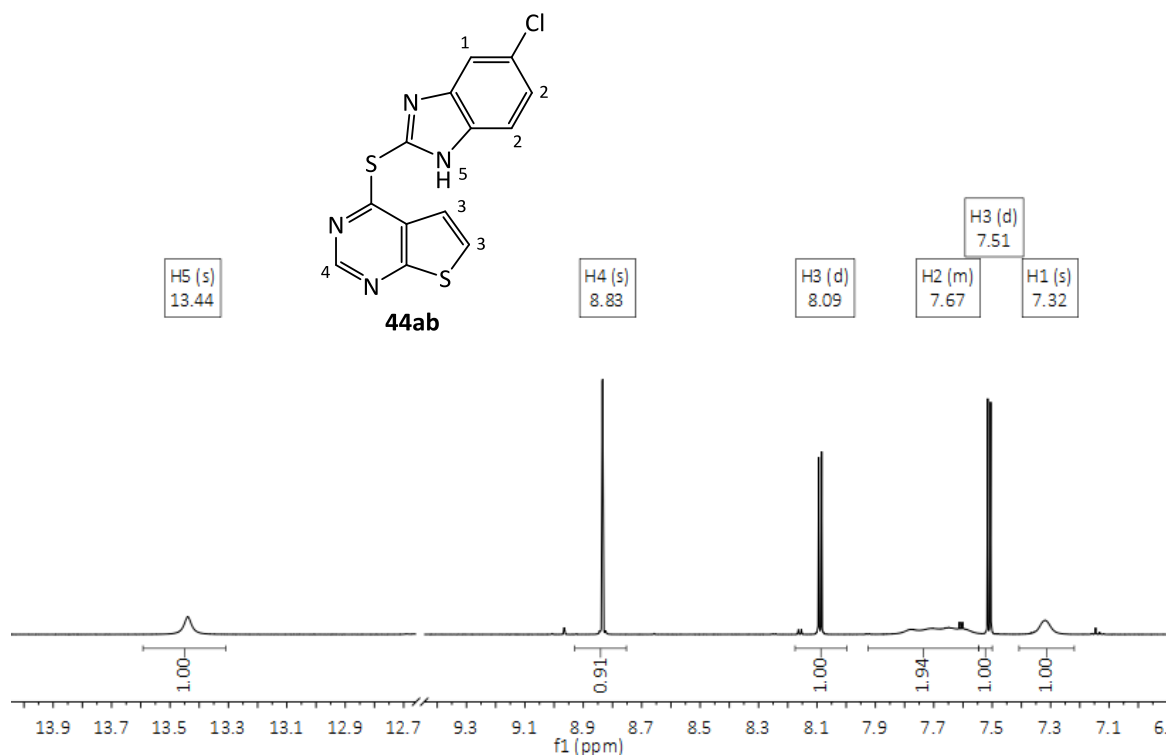
Signale wird auch deutlich, dass das Stoffmengenverhältnis der Isomere etwa 1:1 ist. Die meisten anderen Signale überlagern sich zu Multipletts. Eindeutig zuzuordnen ist noch das breite NH-Signal des Benzimidazolrings (H3 in Abbildung 3-5). Ein doppelter Signalsatz ist analog auch bei **44t**, **44ac** sowie **44ad** in den jeweiligen NMR-Spektren zu beobachten.



**Abbildung 3-5:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44aa**. Die Messung des Spektrums erfolgte bei einer Temperatur von 303.3 K. Das Spektrum zeigt einen doppelten Signalsatz, was vor allem bei den Signalen der Methylgruppe (1) im Hochfeld des Spektrums (2.29 und 2.39 ppm) und beim Signal des Pyrimidinprotons (2) bei 9.27 ppm deutlich wird. Die anderen Signale überlagern sich zu Multipletts, wie das Beispiel des Multipletts bei 8.05–8.06 ppm verdeutlicht. Das Spektrum wurde unterhalb der Koaleszenztemperatur aufgenommen. Die Nummerierung der Atome folgt nicht den IUPAC-Regeln.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44ab** ist hingegen kein doppelter Signalsatz zu beobachten. Jedoch erscheinen vor allem die Signale der Benzenprotonen (H1 und H2 in Abbildung 3-6) niedriger und stark verbreitert im Vergleich zu den Protonensignalen der Thienopyrimidin-Teilstruktur (H3 und H4 in Abbildung 3-6). Die Koaleszenztemperatur von **44ab** liegt nah bei der Messtemperatur (303.3 K), was zur Verbreiterung der Signale

führt. Ein ähnliches Bild zeigt auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44z**, bei dem ebenfalls die Signale der Benzen-Teilstruktur sehr niedrig und breit erscheinen.



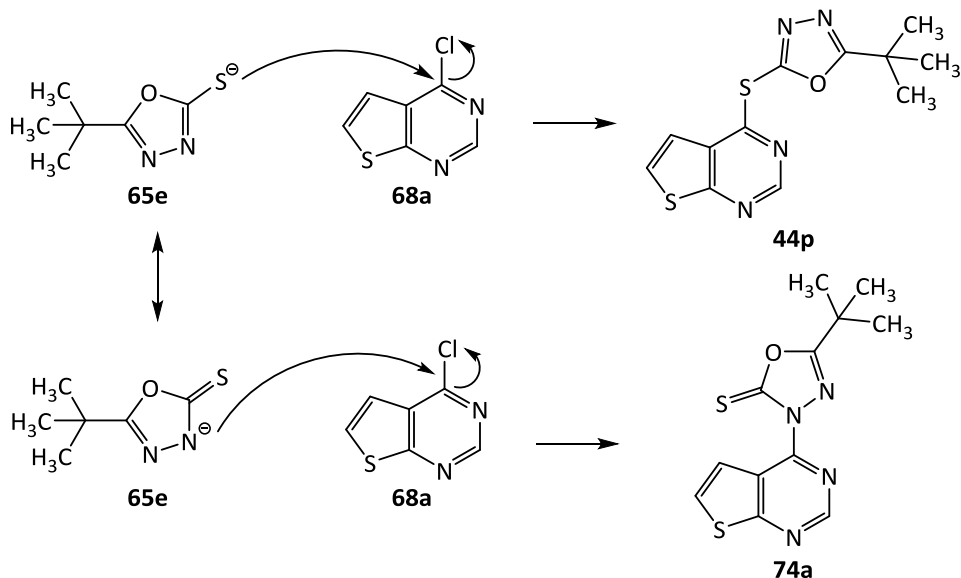
**Abbildung 3-6:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **44ab**. Die Messung des Spektrums erfolgte bei einer Temperatur von 303.3 K. Es ist ein einfacher Signalsatz zu sehen. Die Signale für die Protonen der Benzimidazol-Teilstruktur sind stark verbreitert und sehr flach, was auf eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur hindeutet. Die Nummerierung der Atome folgt nicht den IUPAC-Regeln.

Bei **44u** und **44v** ist im NMR-Spektrum weder eine Verbreiterung der Signale noch ein doppelter Signalsatz zu beobachten. Ein Protonenaustausch ist nicht möglich, da die 1-Position des Imidazolrings (**44v**) bzw. die 4-Position des Triazolrings (**44u**) methyliert ist. Dementsprechend ergibt sich auch kein Gleichgewicht zweier Tautomere.

### 3.2.5.3 Nachweis der möglichen Bildung von Konstitutionsisomeren der Diarylthioether

Aufgrund der Tautomerisierung der 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione **65** (siehe Schema 3-11) besteht die Möglichkeit, dass neben Diarylthioethern auch Produkte, die über den entsprechenden Thioamid-Stickstoff am elektronenarmen Heteroaromaten verknüpft sind, entstehen können. Ebendies konnte bei der Reaktion von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-

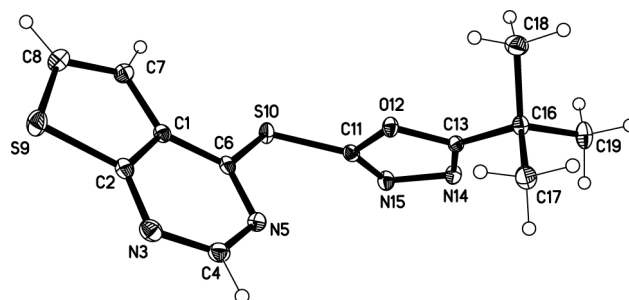
oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) beobachtet werden (Schema 3-18).



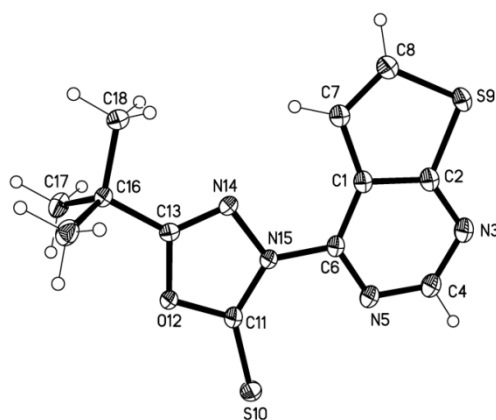
**Schema 3-18:** Vorschlag für die Bildung des Diarylthioethers **44p** und des isomeren 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thions **74a** aus **65e** und **68a**.

Die Synthese wurde mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt, wobei zwei verschiedene Hauptprodukte isoliert wurden. Diese unterscheiden sich in ihrem Laufverhalten bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Der  $R_f$ -Wert des einen Hauptproduktes (**74a**) liegt bei einem Fließmittelgemisch aus Petrolether und Ethylacetat (4:1) bei 0.38. Bei gleichem Fließmittel beträgt der  $R_f$ -Wert des anderen Hauptproduktes (**44p**) 0.25. Unter welchen Reaktionsbedingungen welches der Produkte bevorzugt entsteht, wird in Abschnitt 4 ausführlicher diskutiert. Aufgrund der spektrometrischen Untersuchungen (NMR, EI-MS), konnte eine Identität der Summenformeln beider Verbindungen nachgewiesen werden. Die Konnektivität innerhalb der Moleküle konnte mit Hilfe der spektrometrischen Untersuchungen jedoch nicht eindeutig charakterisiert werden. Bei beiden Verbindungen gelang es durch Umkristallisation aus Ethylacetat (**44p**) bzw. einem Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat (**74a**) Kristalle zu erzeugen, die durch Röntgenstrukturanalyse in den Laboratorien von Prof. Dr. P. G. Jones (Technische Universität Braunschweig) untersucht werden konnten. Die Illustration der Röntgenkristallstruktur von **44p** zeigt, dass es sich

bei der Verbindung um den Diarylthioether handelt (Abbildung 3-7). Im Gegensatz hierzu haben sich bei **74a** die beiden Edukte nicht zu einer Thioether-Struktur verbunden; stattdessen ist das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion entstanden (Abbildung 3-8).



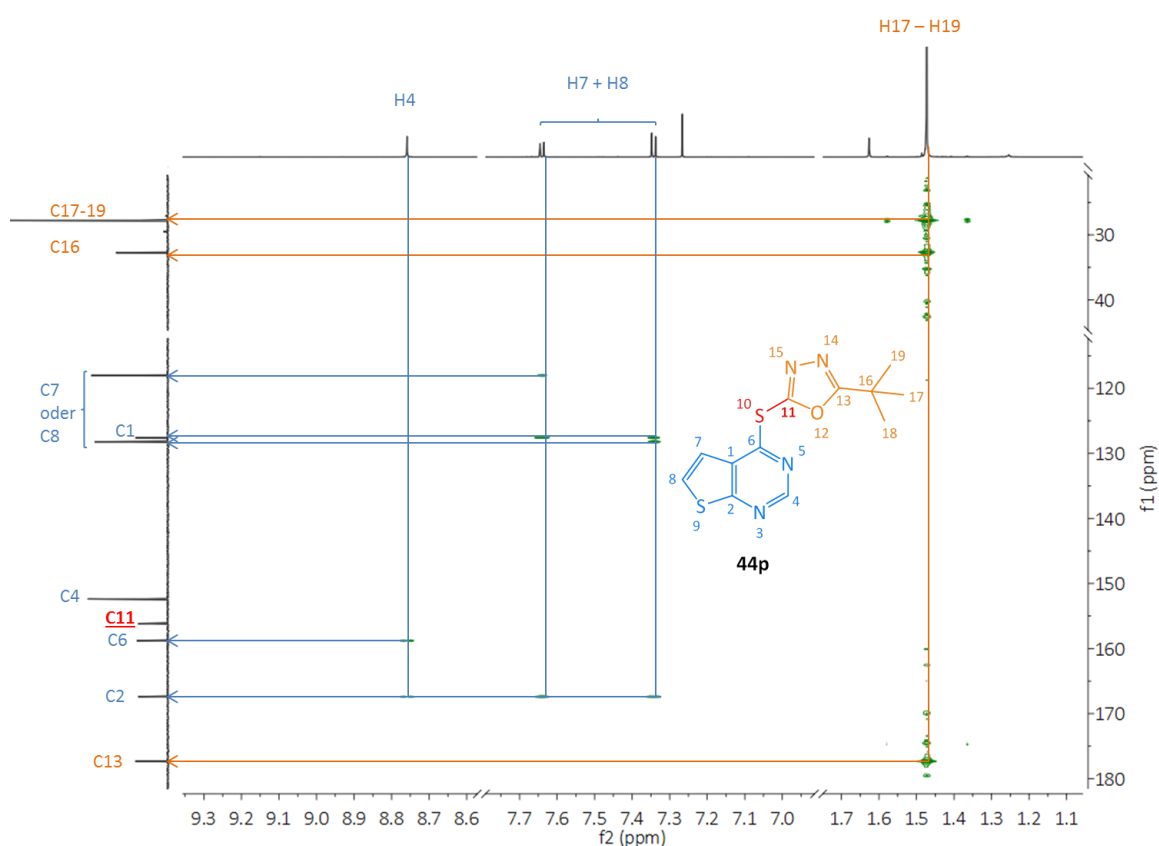
**Abbildung 3-7:** Abbild der Röntgenkristallstruktur von 2-*tert*-Butyl-5-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol **44p**. Die Nummerierung dient ausschließlich der Identifikation der Atome und entspricht nicht den IUPAC-Regeln.



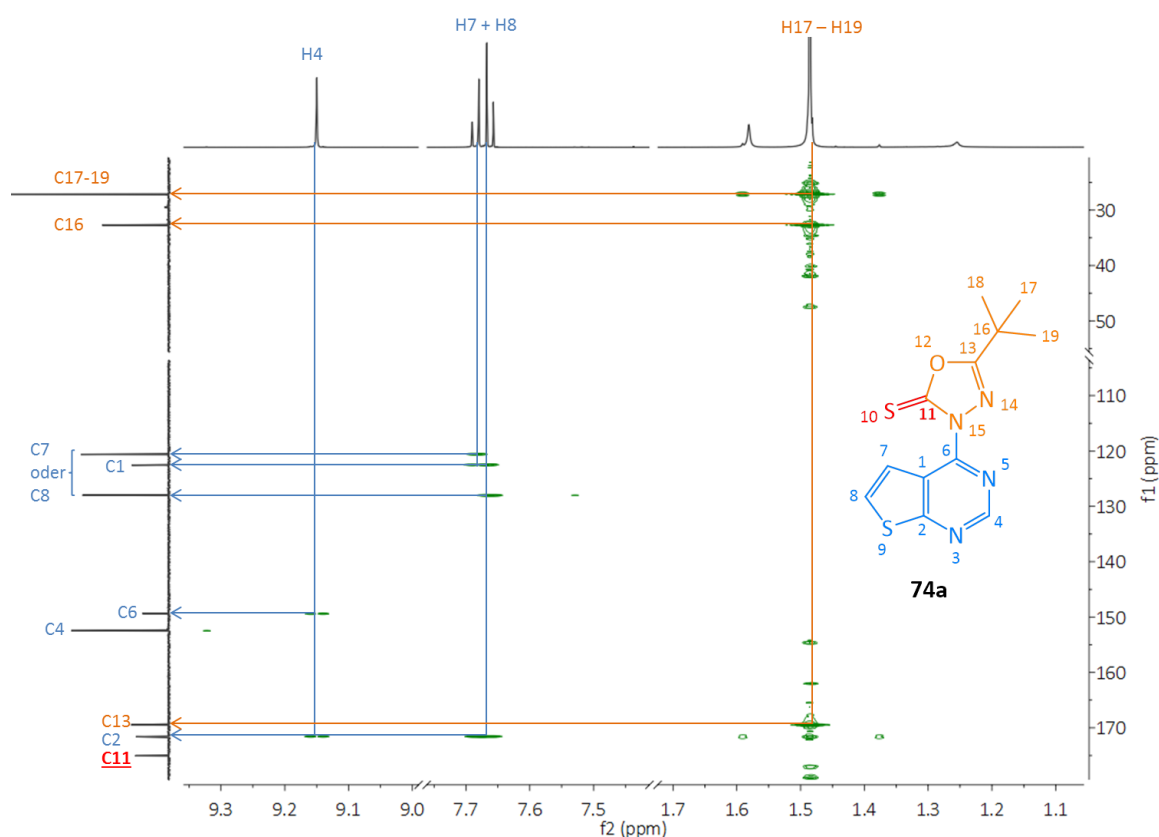
**Abbildung 3-8:** Abbild der Röntgenkristallstruktur von 5-*tert*-Butyl-3-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion **74a**. Die Nummerierung dient ausschließlich der Identifikation der Atome und entspricht nicht den IUPAC-Regeln.

Zusätzlich wurden zweidimensionale Magnetresonanzspektren (COSY, HSQC und HMBC) von **44p** und **74a** analysiert. Vor allem mit Hilfe der HSQC- und HMBC-Experimente wurden wichtige Hinweise für die Zuordnung der NMR-Signale zu den entsprechenden Atomen erhalten (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10). Durch ein Ausschlussverfahren kann jeweils die chemische Verschiebung von C11 (Nummerierung in Anlehnung an die

Röntgenkristallstrukturen von **44p** und **74a**), dem Kohlenstoffatom, das sich bei beiden Isomeren deutlich unterscheiden sollte, bestimmt werden. C11 kann aufgrund seiner Position mit keinem Proton im Molekül koppeln, weshalb im HMBC- und HSQC-Spektrum kein Signal für C11 zu sehen ist. Für alle anderen Kohlenstoffatome der beiden Isomere können Kopplungen zu Protonen im HSQC- oder HMBC-Spektrum dargestellt werden. In beiden HMBC-Spektren (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10) kann sehr gut die Kopplung der Methylprotonen mit den Methylkohlenstoffatomen und dem quartären Kohlenstoffatom der *tert*-Butylgruppe beobachtet werden.



**Abbildung 3-9:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von **44p**. Die Nummerierung der Atome dient nur der Zuordnung der Signale und ist an die Röntgenkristallstruktur angelehnt. Sie entspricht nicht den IUPAC-Regeln. Das Singulett bei 7.26 ppm entspricht dem Protonensignal nicht deuterierter Moleküle im Lösungsmittel Deuteriochloroform. Das Spektrum wurde zur Verdeutlichung der Signalzuordnung in PowerPoint graphisch nachbearbeitet.

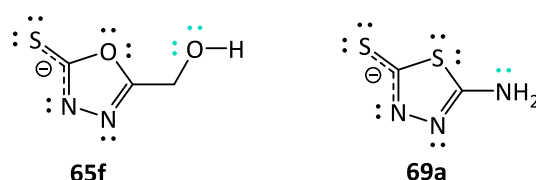


**Abbildung 3-10:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von **74a** mit Zuordnung der Signale. Die Nummerierung der Atome dient nur der Zuordnung der Signale und ist an die Röntgenkristallstruktur angelehnt. Sie entspricht nicht den IUPAC-Regeln. Das Spektrum wurde zur Verdeutlichung der Signalzuordnung in PowerPoint graphisch nachbearbeitet.

Außerdem ist die  $^3J$ -Kopplung der Methylprotonen zum C13 am Oxadiazol auszumachen. Die Signale dieses Kohlenstoffatoms sind bei 177 ppm (**44p**) bzw. 169 ppm (**74a**) zu sehen und somit stark in Richtung Tieffeld verschoben. Für das Pyrimidinkohlenstoffatom C4 ist im HMBC von **44p** und **74a** keine Kopplung mit Protonen zu beobachten, da alle möglichen Kopplungspartner zu weit entfernt liegen. Jedoch ist mit Hilfe des HSQC-Experiments die Kopplung über eine Bindung zum Proton H4 zu erkennen. Zudem sind die weiteren Kopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen des Thieno[2,3-*d*]pyrimidins zu sehen, sodass das isolierte C11 des Oxadiazols für beide Isomere identifiziert werden kann. Da C11 von **74a** (175 ppm) das Kohlenstoffatom einer Thiocarbonylfunktion ist (Abbildung 3-10), unterscheidet sich dessen chemische Verschiebung sehr stark von der des C11 in **44p** (156 ppm) (Abbildung 3-9).

Dieser Fall der Isomerenbildung beschränkt sich prinzipiell nicht auf die Reaktion von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin mit unterschiedlichen 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thionen. Jedes der verwendeten Nucleophile zur Synthese der Diarylthioether enthält, genau wie die 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione, eine Thioamidstruktur. Das Stickstoffatom der Thioamidstruktur jener Verbindungen hätte bei diesen Synthesen potentiell als Nucleophil fungieren können, wodurch zu **74a** analoge Reaktionsprodukte denkbar wären.

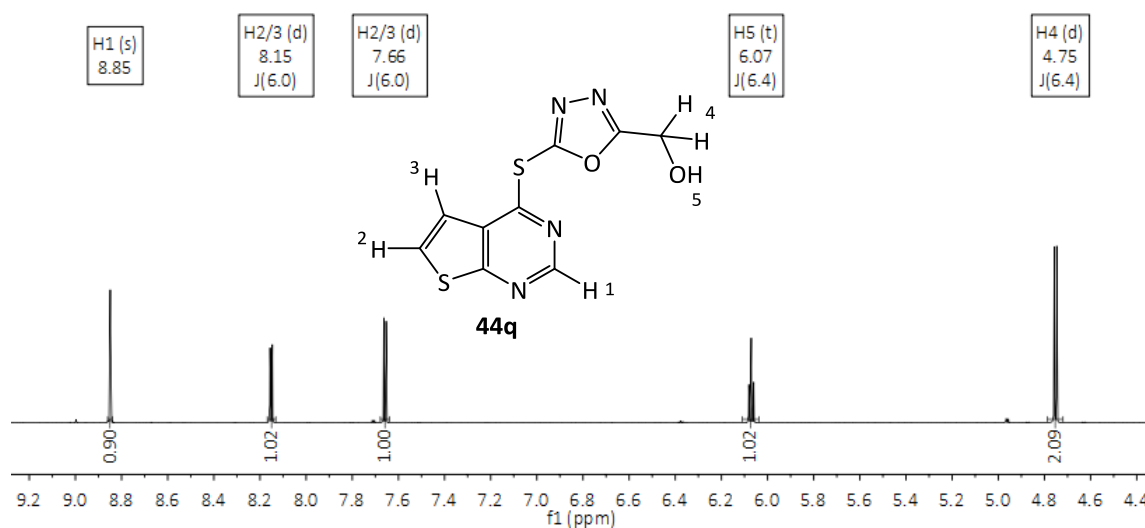
Neben der hier beschriebenen Isomerenbildung konnten bei einigen Verbindungen auch auf andere Weise Konstitutionsisomere gebildet werden. Wie schon am Beispiel von **71** zu sehen war (Schema 3-15), konnten auch andere nucleophile Positionen im Molekül als die jeweilige Thioamid-Teilstruktur als Reaktionszentrum fungieren. Bei den Synthesen zu den Zielstrukturen **44q** und **44y** konnte bei den verwendeten Thionen **65f** und **69a** die Hydroxylgruppe bzw. die Aminogruppe potentiell als Nucleophil reagieren (Abbildung 3-11). Allerdings sollte die Nucleophilie der genannten funktionellen Gruppen geringer sein als die des konkurrierenden Thiolats.



**Abbildung 3-11:** 5-Hydroxymethyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65f**) und 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2(3*H*)-thion (**69a**) mit Darstellung der freien Elektronenpaare. Die in Türkis markierten freien Elektronenpaare der Hydroxylgruppe bzw. der Aminogruppe können elektronenarme Heteroaromaten möglicherweise nucleophil angreifen.

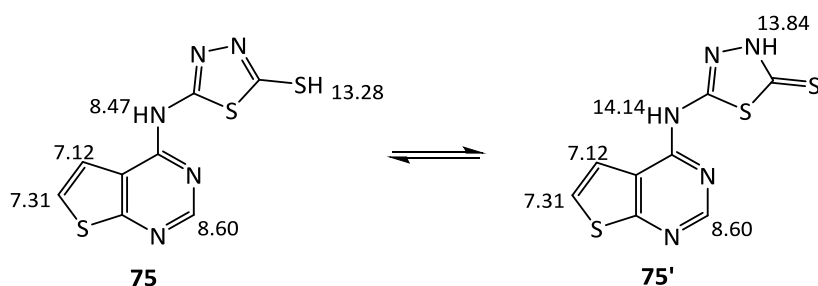
Mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren war es möglich, diese Form der Isomerenbildung bei den Zielstrukturen **44q** und **44y** auszuschließen. Im Falle von **44q** ist die Kopplung zwischen dem Triplet bei 6.07 ppm und dem Dublett bei 4.75 ppm ein deutlicher Hinweis dafür, dass die Hydroxylgruppe ein Proton trägt und dieses mit den Methylenprotonen koppelt (Abbildung 3-12). Nur auf diese Weise konnte bei **44q** ein Triplet entstehen und deshalb konnte die Verknüpfung im Molekül nicht über den aliphatischen Alkohol erfolgt sein.





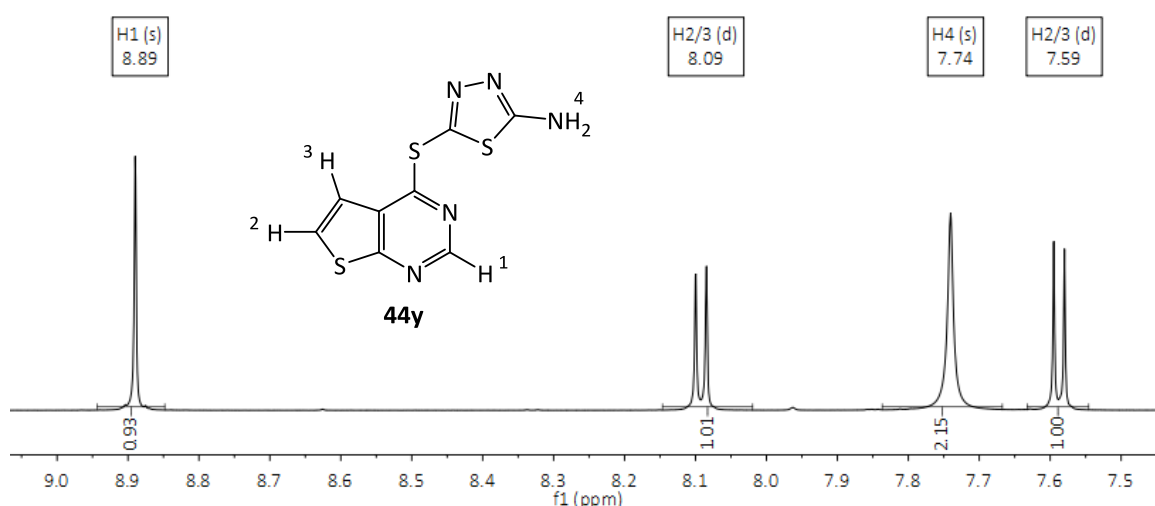
**Abbildung 3-12:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **44q**. Das Singulett bei 8.85 ppm kann dem Pyrimidinproton (H1) und die Dubletts bei 7.66 und 8.15 ppm können den Thiophenprotonen (H2, H3) zugeordnet werden. Das Triplett bei 6.07 ppm ist das Protonensignal der Hydroxylgruppe (H5). Die Methylenprotonen, die mit dem Proton der Hydroxylgruppe koppeln, ergeben ein Dublett bei 4.75 ppm. Die Kopplungskonstante des Triplets und dieses Dubletts beträgt 6.4 Hz.

Das Singulett bei 7.74 ppm mit einer Wertigkeit von zwei Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44y** (Abbildung 3-14) ist ein starker Hinweis auf das Vorhandensein einer Aminogruppe mit zwei identischen Protonen. Wäre der nucleophile Angriff bei der Synthese von selbiger Aminogruppe ausgegangen, ergäben sich als mögliche Isomere die Diarylamine **75** und **75'** (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13:** Die Konstitutionsisomere von **44y** mit Diarylaminstruktur, die im Tautomerengleichgewicht zwischen Thiol- (**75**) und Thionstruktur (**75'**) stehen, wären mögliche unerwünschte Zielverbindungen. Mit Hilfe von ChemBioDraw Ultra (Cambridge Soft, Version 13.0.2) wurde die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale (Angaben in ppm) vorausgesagt.

Bei diesen wäre nur ein Proton der Aminogruppe vorhanden und zusätzlich ein weiteres Proton eines Thiols bzw. eines Thioamidstickstoffs. Da jene Protonen nicht identisch sind, wäre es unwahrscheinlich, dass diese ein einziges Singulett ergeben wie im Falle des in Abbildung 3-14 abgebildeten Spektrums. Zur Unterstützung dieser Vermutung wurde eine Vorhersage der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale von **75** und **75'** durchgeführt (Abbildung 3-13). Bei der Thiolverbindung **75** werden die Protonensignale der Thiolgruppe sowie des sekundären Amins deutlich in ihrer chemischen Verschiebung unterschieden, was nicht dem Spektrum in Abbildung 3-14 entspricht. Die N-H Signale bei **75'** werden mit sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen vorausgesagt, die sich jedoch jeweils stark von der chemischen Verschiebung des Singuletts bei 7.74 ppm in Abbildung 3-14 unterscheidet. Das Thioamid-Proton von **75'** soll demnach eine ähnliche Verschiebung haben wie das der 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione **65** (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Voraussage der NMR-Signale unterstützt somit die Vermutung, dass das Spektrum in Abbildung 3-14 nicht das der Isomere **75** oder **75'**, sondern tatsächlich das von **44y** ist.



**Abbildung 3-14:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **44y**. Das Singulett bei 8.89 ppm lässt sich dem Pyrimidinproton (H1), die Dubletts den Thiophenprotonen (H2, H3) und das breite Singulett bei 7.74 ppm den Protonen der Aminogruppe zuordnen. Die Nummerierung der Atome dient nur deren Zuordnung zu NMR-Signalen und richtet sich nicht nach den IUPAC-Regeln.

#### 3.2.5.4 Identifizierung der Isomere der Diarylthioether mit Hilfe der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

Zur sicheren Unterscheidung der gewünschten Thioetherverbindungen von den jeweiligen Konstitutionsisomeren nach dem Vorbild von **74a**, müssten von allen Verbindungen Kristallstrukturen erzeugt werden. Dies ist jedoch aufwändig. Zudem sind Kristalle in der dazu erforderlichen hohen Qualität nicht in jedem Fall leicht zugänglich. Deshalb wurde nach einer einfacheren Möglichkeit gesucht, die Isomere mit hoher Wahrscheinlichkeit voneinander zu unterscheiden.

Aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von **44p** und **74a** geht hervor, dass sich die chemische Verschiebung eines Thiocarbonylkohlenstoffs, wie er in **74a** zu finden ist, und die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms eines Thioethers wie in **44p**, deutlich unterscheiden. Dies ist auch konform mit den NMR-Daten der 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione **65** (siehe Abschnitt 3.2.2), bei welchen die jeweiligen Thiocarbonylkohlenstoffatome ähnlich wie bei **74a** chemische Verschiebungen über 170 ppm zeigen. Zudem stützen auch Angaben aus der Literatur die genannten Werte für Thiocarbonyl.<sup>114, 117–119</sup>

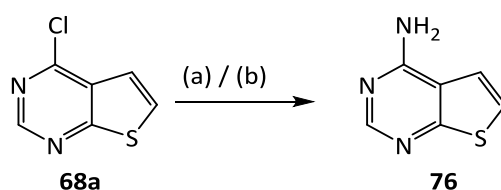
Auf Basis der starken Tieffeldverschiebungen, die bei Thiocarbonylkohlenstoffatomen auftritt, kann schon aus eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren eine entscheidende Erkenntnis gewonnen werden, ob der Diarylthioether vorliegt oder das entsprechende Konstitutionsisomer. Bei 66% der Testverbindungen mit der allgemeinen Struktur **44** oder **72** liegen alle Kohlenstoffsignale unterhalb von 170 ppm, weshalb mit einiger Sicherheit davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen Verbindungen tatsächlich um die Diarylthioether handelt. Beim restlichen Drittel der Substanzen lassen sich die jeweiligen Signale mit chemischen Verschiebungen oberhalb von 170 ppm logisch durch andere Gruppierungen erklären. Beispielsweise ist bei **44p** die *tert*-Butylgruppe eine Ursache für die starke Tieffeldverschiebung des Oxadiazolkohlenstoffatoms C13 (siehe Abbildung 3-9). Dies trifft auch auf **72d** zu, das ebenfalls einen *tert*-Butylsubstituenten enthält. Ähnliches ist ferner bei **44n** und **44r** zu beobachten, die an der entsprechenden Position am Oxadiazolring einen Piperidylsubstituenten tragen. Größere oder verzweigte Alkylreste sorgen für eine Tieffeldverschiebung des  $^{13}\text{C}$ -Signals des Kohlenstoffatoms, an den der Substituent direkt gebunden ist, von etwa 15 bis 20 ppm.<sup>123</sup> Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **44y** findet sich ein Signal über 173 ppm. Da **44y** einen Amino-

substituenten enthält und dieser aufgrund der Elektronegativität des Stickstoffs für eine Entschirmung des benachbarten Kohlenstoffatoms sorgt, wird das  $^{13}\text{C}$ -Signal dieses Kohlenstoffatoms ins tiefe Feld verschoben. Würde es sich bei dieser Verbindung um ein Thion handeln, wäre die chemische Verschiebung deutlich stärker, denn bei Thiocarbonylen von Thiadiazolen liegen entsprechende Signale typischerweise oberhalb von 180 ppm.<sup>118, 124, 125</sup>

Unter Berücksichtigung der vorliegenden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und der Angaben aus Literaturstellen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die jeweilige Verbindung die gewünschte Thioether-Struktur aufweist, solange im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum keine Signale oberhalb von 170 ppm vorzufinden sind.

### 3.2.6 Synthese von Diarylaminen als Testverbindungen

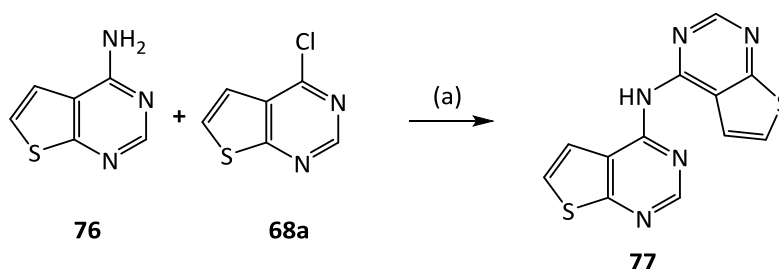
Für die Synthese von Diarylaminen wurden zwei Varianten in Betracht gezogen, bei denen die Thienopyrimidin-Teilstruktur erhalten bleibt. 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) konnte durch Ammonolyse in 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**76**) umgewandelt werden (Schema 3-19) und dieses dann als Nucleophil eingesetzt werden. Das Amin **76** konnte mit wässriger Ammoniaklösung entweder durch konventionelles Erhitzen über 24 h bei 90 °C nach Lv *et al.*<sup>126</sup> oder mit 1,4-Dioxan als Lösungsmittel bei 135 °C und Mikrowelleneintrag über 2 h analog zu SMITH *et al.*<sup>127</sup> in guten Ausbeuten erhalten werden.



**Schema 3-19:** Synthese von 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**76**): (a) aq. NH<sub>3</sub> (26%), 90 °C, 24 h, 73%; (b) aq. NH<sub>3</sub> (26%), 1,4-Dioxan, 135 °C,  $\mu\text{W}$ , 2 h, 71%.

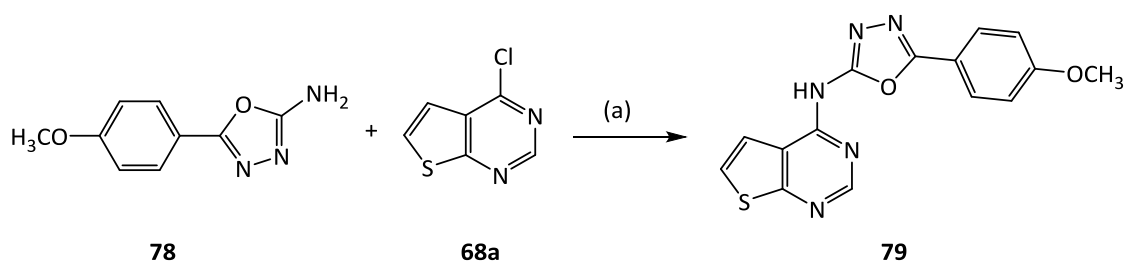
Aus 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**76**) konnte unter Einsatz von Natriumhydrid mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) unter Stickstoffatmosphäre das symmetrisch disubstituierte Amin **77** hergestellt werden (Schema 3-20). Zur Darstellung der Diarylthioether reichten in der Regel organische Aminbasen aus, um die nucleophile aromatische Substitution zu unterstützen. Die Acidität der aromatischen Aminogruppe ist

jedoch weniger ausgeprägt als die der Thiole, weshalb eine stärkere Base zum Einsatz kommen musste. Durch Natriumhydrid konnte die Aminogruppe deprotoniert werden, sodass das resultierende Anion nucleophil das Chloratom in **68a** substituieren konnte. Die analoge Umsetzung des Amins **76** mit 6-Chlor-7-deazapurin war hingegen nicht erfolgreich.



**Schema 3-20:** Synthese des Diarylamins **77**: (a) NaH, DMF, Stickstoffatmosphäre, RT → 100 °C, 15 h.

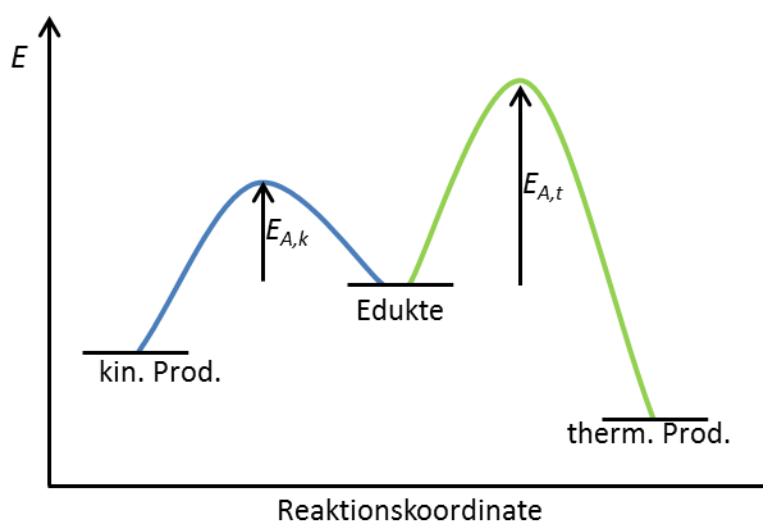
Als zweite Variante wurde 4-Chlorthienopyrimidin mit dem kommerziell erworbenen 2-Amino-1,3,4-oxadiazol **78** umgesetzt, um das Diarylamin **79** zu erhalten. Auch hierbei führten die für die Synthese der Diarylthioether üblichen Bedingungen nicht zum Erfolg. Die Reaktion wurde deshalb unter Buchwald-Hartwig-Bedingungen in Anlehnung an eine Vorschrift von GARNIER *et al.*<sup>128</sup> durchgeführt (Schema 3-21). Das hierbei in niedriger Ausbeute (15%) isolierte Produkt konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr biologisch evaluiert werden. **79** ist jedoch trotzdem von Interesse, da zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine Verbindung mit einer *N*-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin-Grundstruktur publiziert war.



**Schema 3-21:** Synthese von 5-(4-Methoxyphenyl)-*N*-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**79**). (a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, Xantphos, 1,4-Dioxan, N<sub>2</sub>-Atmosphäre, Reflux, 5 h.

## 4 Untersuchung des Reaktionsverlaufs der Synthese ausgewählter Diarylthioether

Bei der chemischen Synthese können Konkurrenzreaktionen auftreten, welche einer thermodynamischen oder kinetischen Kontrolle unterliegen. Das kinetische Produkt ist per Definition dasjenige, das schneller entsteht. Die Reaktion zum kinetisch kontrollierten Produkt läuft in der Regel bei milden Bedingungen ab. Die Aktivierungsenergie für die Hin- und Rückreaktion der kinetisch kontrollierten Reaktion ist verhältnismäßig gering, sodass bei höherer Reaktionstemperatur das kinetische Produkt wieder zu den Edukten zurückreagieren kann. Die thermodynamisch kontrollierte Reaktion hat in der Regel eine höhere Aktivierungsenergie und benötigt meist längere Reaktionszeiten. Das daraus entstehende Produkt ist jedoch energieärmer und damit stabiler als das kinetisch kontrollierte Produkt. Die thermodynamisch kontrollierte Reaktion kann durch Energiezufuhr, beispielsweise hohe Temperaturen, beschleunigt werden. Das Gleichgewicht liegt dabei stark auf der Produktseite, da die Differenz der Bildungsenthalpien zwischen Edukten und den thermodynamisch kontrollierten Produkten besonders hoch ist (Abbildung 4-1).<sup>129</sup>

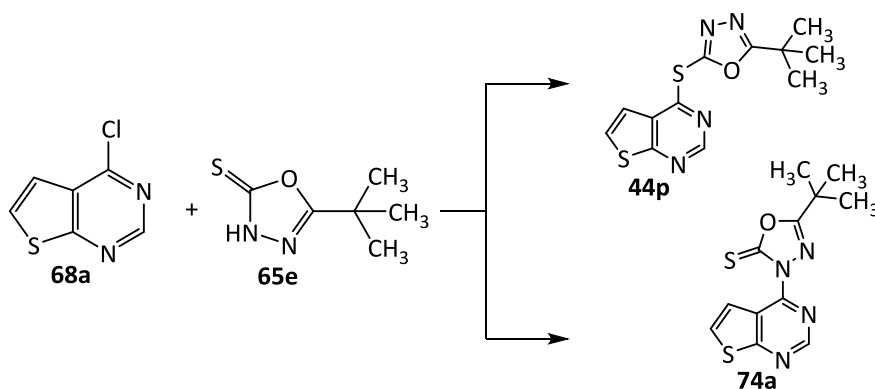


**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung der Energieänderung im Reaktionsverlauf einer kinetisch kontrollierten Reaktion (blau) und einer thermodynamisch kontrollierten Reaktion (grün).  $E_{A,k}$ : Aktivierungsenergie der kinetisch kontrollierten Reaktion,  $E_{A,t}$ : Aktivierungsenergie der thermodynamisch kontrollierten Reaktion, kin. Prod.: kinetisch kontrolliertes Produkt, therm. Prod.: thermodynamisch kontrolliertes Produkt.

#### 4.1 Beobachtung von Reaktionsverläufen mittels HPLC

Ob die beiden Produkte **44p** und **74a** aus der Reaktion von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) mit 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (Schema 3-18) einer kinetischen bzw. thermodynamischen Kontrolle unterliegen, wurde unter anderem durch die Untersuchung des Reaktionsverlaufs überprüft. Hierzu wurde die Reaktion mehrfach bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tabelle 4-1).

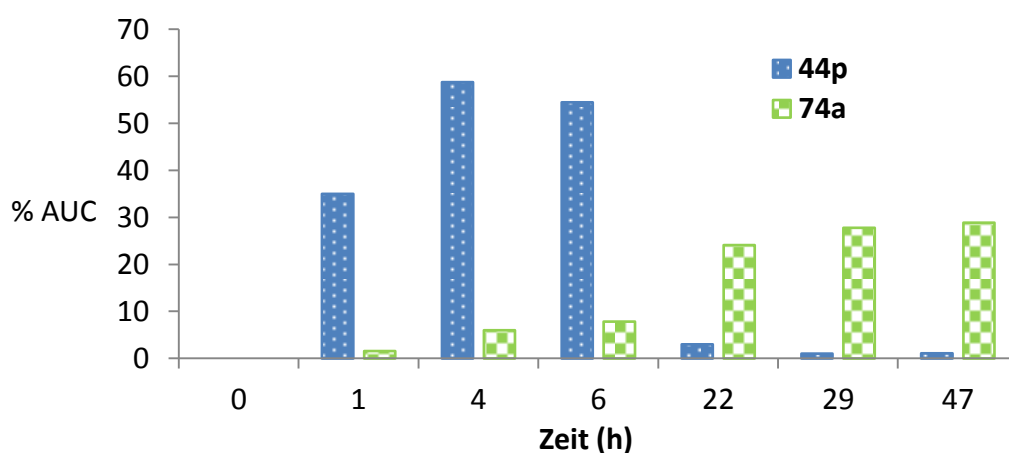
**Tabelle 4-1:** Reaktionsansätze zur Kontrolle des Verlaufs der Reaktion zwischen 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) und 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**).



Reaktionsansatz	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Beobachtungszeit [h]
1a	Ethanol	78	47
1b	Ethanol	78	22
2a	Butan-1-ol	118	3
2b	Butan-1-ol	118	46
3	Ethanol	20	192
4	Ethanol	68	5
5	Toluen	111	7
6	DMF	120	28

Die Edukte wurden immer im gleichen molaren Verhältnis zueinander eingesetzt (1 Äquivalent **68a** : 1.1 Äquivalente **65e**). Als Base wurde stets Triethylamin verwendet. Es wurden jeweils im Laufe der Reaktion Proben des Reaktionsgemisches entnommen, welche dann per Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) untersucht wurden. Zur

Auswertung der Chromatogramme wurde die 100%-Methode verwendet und damit jeweils der Anteil des im Reaktionsverlauf entstandenen Konstitutionsisomers berechnet. Dem Reaktionsverlauf von Reaktionsansatz 1b ist zu entnehmen, dass in der Anfangsphase der Reaktion hauptsächlich eines der beiden Isomere entsteht. Sowohl durch den Vergleich der Retentionszeit mit der Reinsubstanz als auch durch die nachfolgend aufgenommenen NMR-Spektren der isolierten Substanz ließ sich zeigen, dass es sich bei diesem Isomer um den Diarylthioether **44p** handelt. Mit zunehmender Reaktionszeit wird der Anteil dieses Isomers geringer und dafür bildet sich vermehrt **74a**, das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion (Abbildung 4-2). Bei der Vermessung einer Probe nach 15 Stunden des analogen Reaktionsansatzes 1b lag der Anteil von **74a** sogar bei 52%, also deutlich höher als nach 22 bis 47 Stunden in Reaktionsansatz 1a. Mit fortschreitender Reaktionszeit nimmt der Anteil der Nebenprodukte, die zusätzlich zu **44p** und **74a** entstehen, deutlich zu und der prozentuale Anteil von **74a** wird deshalb wieder geringer.

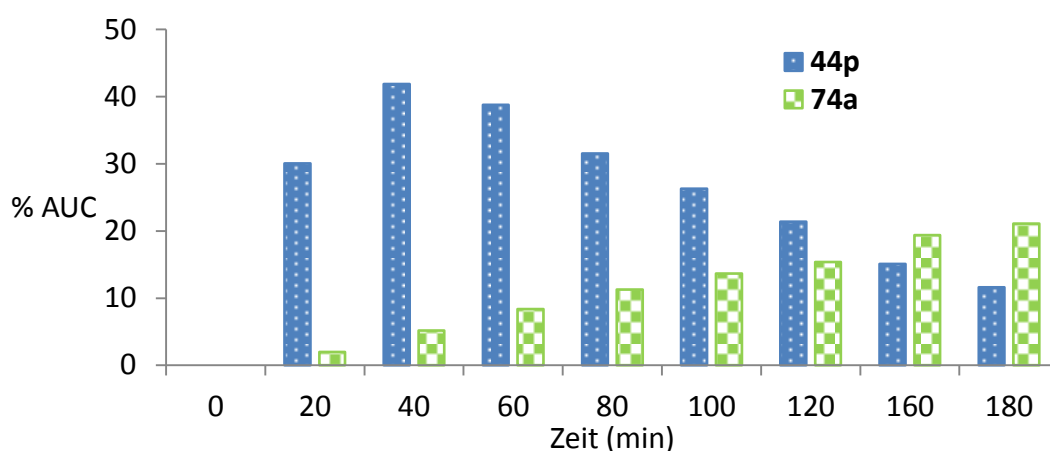


**Abbildung 4-2:** Reaktionsansatz 1a in Ethanol unter Reflux. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Der Reaktionsverlauf bei Ansatz 4, der bei geringerer Reaktionstemperatur durchgeführt wurde, war sehr ähnlich. Die Entstehung von **74a** verlief geringfügig langsamer, sodass der Diarylthioether nach 5 Stunden Reaktionszeit in moderater Ausbeute und Reinheit isoliert werden konnte.

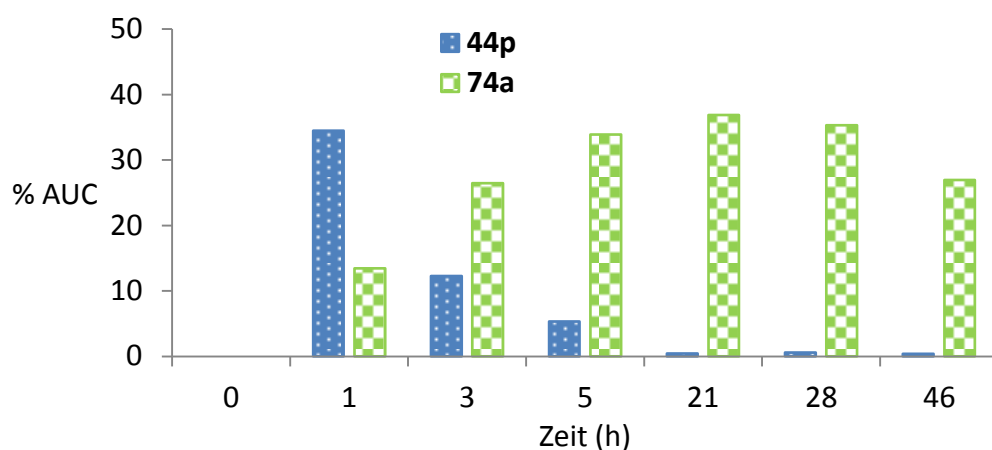


Wurde Ethanol als Lösungsmittel durch Butan-1-ol ersetzt und die Temperatur auf 118 °C erhöht (Reaktionsansätze 2a und 2b), zeigte der Reaktionsverlauf ein leicht verändertes Bild. Nach 40 min Reaktionszeit lag der Anteil des Thioethers bei 42% (Reaktionsansatz 2a, Abbildung 4-3). Zu diesem Zeitpunkt **74a** war noch kaum vorhanden. Jedoch wurde schon nach 160 min eine geringere Menge von **44p** im Vergleich zu **74a** vorgefunden. Die Umwandlung von einem zum anderen Isomer fand also bei höherer Temperatur erwartungsgemäß schneller statt.



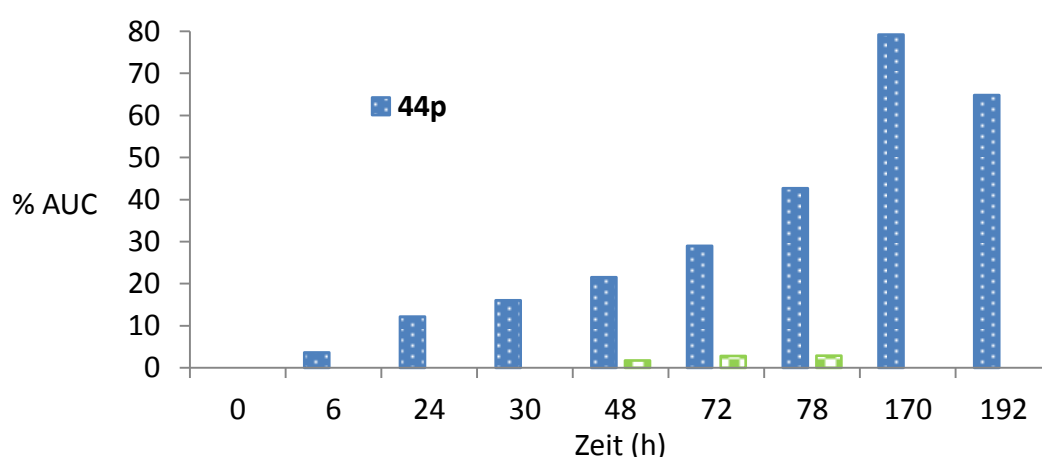
**Abbildung 4-3:** Reaktionsansatz 2a in Butan-1-ol unter Reflux. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Über einen längeren Beobachtungszeitraum (Reaktionsansatz 2b, Abbildung 4-4) konnte festgestellt werden, dass **44p** nach 21 Stunden nur noch in kaum messbaren Mengen vorhanden ist. Zu diesem Zeitpunkt wurde der maximale Anteil von **74a** vermessen. Bei diesem Ansatz wurde vergleichbar mit Reaktionsansatz 1a der Anteil von **74a** bei längerer Reaktionszeit wieder geringer.



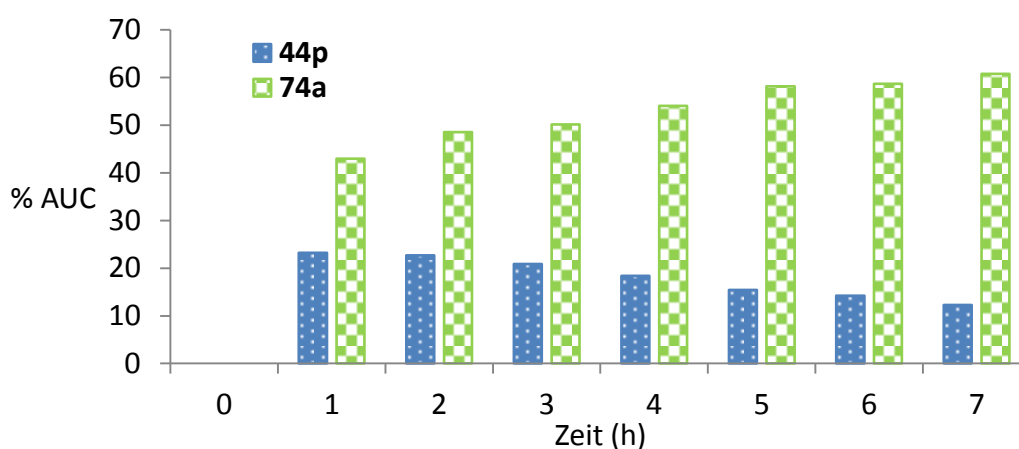
**Abbildung 4-4:** Reaktionsansatz 2b in Butan-1-ol unter Reflux. Im Vergleich zu Ansatz 2a mit längerem Beobachtungszeitraum. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Wurde die Reaktion wie in Reaktionsansatz 3 bei Raumtemperatur durchgeführt, verlief die Reaktion sehr langsam (Abbildung 4-5). Jedoch war es möglich, den Diarylthioether **44p** nach einer Reaktionszeit von 170 Stunden, in der der Produktumsatz stetig anstieg, in einer guten Rohausbeute von 79% darzustellen. Dies stellte das Maximum im Beobachtungszeitraum dar. Bei 192 Stunden lag der Anteil von **44p** nur noch bei 65%. Die isomere Verbindung **74a** entstand bei Raumtemperatur im gesamten Reaktionsverlauf nur mit einem Anteil von maximal 3%.



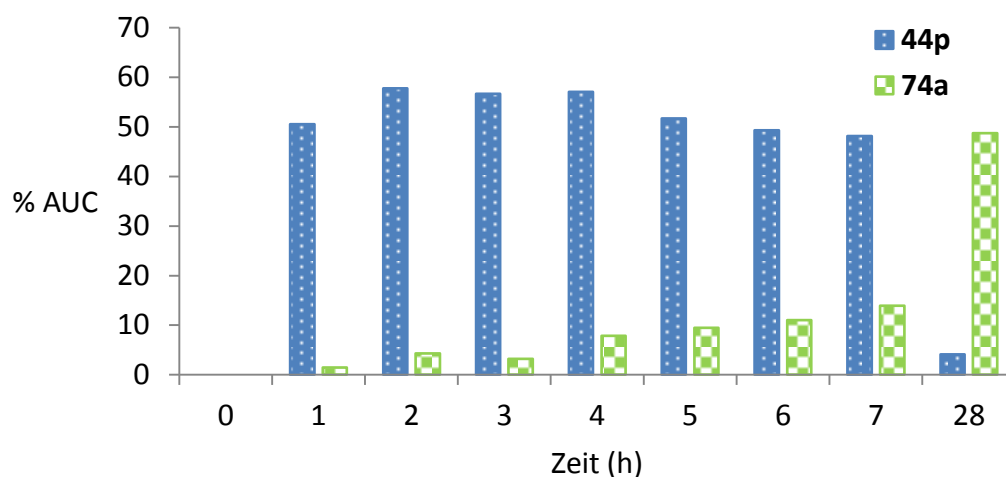
**Abbildung 4-5:** Reaktionsansatz 3 in Ethanol bei Raumtemperatur. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Bisher wurden nur die Reaktionsverläufe in polar protischen Lösungsmitteln beschrieben. Bei Reaktionsansatz 5 wurde das apolare Toluol als Solvens verwendet und die Lösung zum Sieden erhitzt. Schon nach einer Stunde war das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion **74a** das Hauptprodukt im Reaktionsansatz (Abbildung 4-6), im Vergleich zu den Reaktionen in Ethanol oder Butan-1-ol entstand **74a** also schon viel früher. Der Anteil stieg mit fortschreitender Reaktion weiter an, wohingegen die Menge von **44p** im Beobachtungszeitraum stetig geringer wurde.



**Abbildung 4-6:** Reaktionsansatz 5 in Toluol bei 111 °C. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Wurde die Reaktion im polar aprotischen Lösungsmittel DMF durchgeführt, verhielt sich der Reaktionsverlauf ähnlich wie bei den Reaktionen in Ethanol und Butan-1-ol. Über den beobachteten Zeitraum von 7 Stunden überwog der Anteil des Diarylthioethers im Reaktionsgemisch (Abbildung 4-7). Bei einem weiteren Messpunkt nach 28 Stunden hatten sich die Verhältnisse umgekehrt und **74a** war nun das Hauptprodukt. Trotz des hohen Energieeintrags entstand das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion nur vergleichsweise langsam, denn nach 7 Stunden Reaktionszeit lag dessen Anteil bei 14%, der des Thioethers jedoch bei 48%. Viele der Synthesen zu den Diarylthioether-Testverbindungen wurden bei 120 °C in DMF durchgeführt. Die langsame Entstehung von **74a** unter diesen Reaktionsbedingungen ist deshalb positiv zu bewerten.

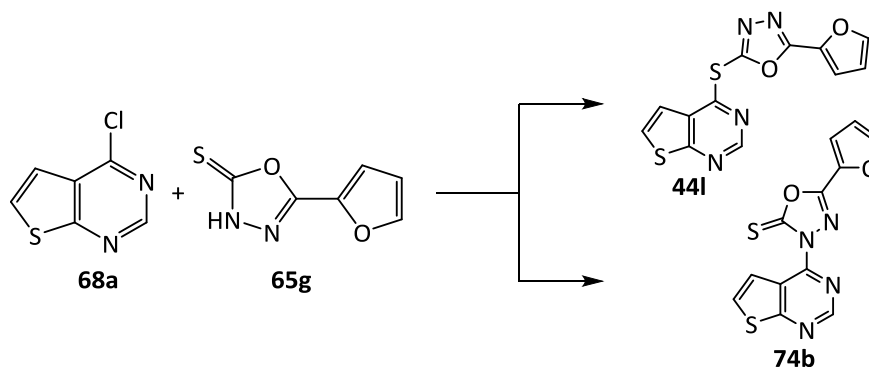


**Abbildung 4-7:** Reaktionsansatz 6 in DMF bei 120 °C. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44p** (blau) und **74a** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

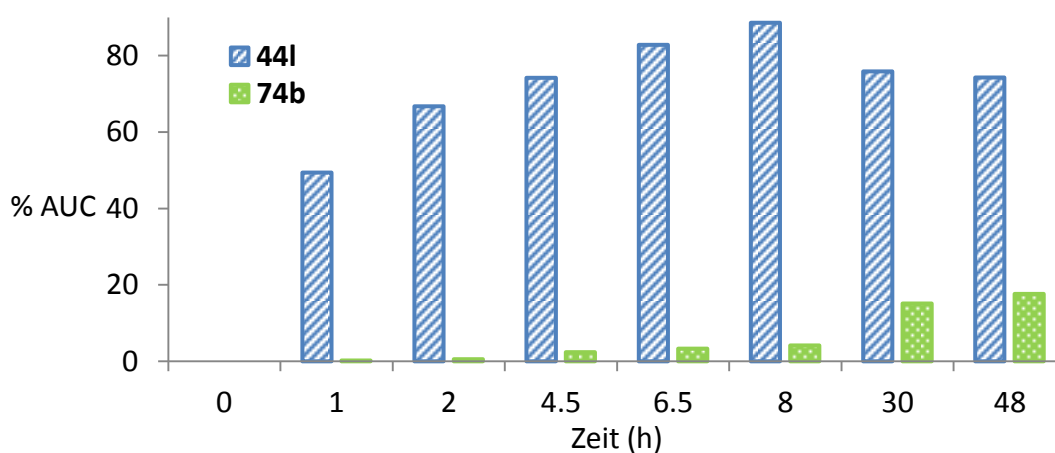
Zusammenfassend zeigen die gesammelten Ergebnisse, dass mit zunehmender Reaktionszeit und vor allem höherer Temperatur bevorzugt das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion **74a** entsteht. Im apolaren Toluol ist schon nach einer Stunde Reaktionszeit mit fast doppelt so hohem Anteil wie **44p** hauptsächlich **74a** als Produkt entstanden und damit deutlich früher als bei vergleichbaren Bedingungen in Butan-1-ol. Soll der Thioether **44p** isoliert werden, sind niedrige Temperaturen und/oder kürzere Reaktionszeiten bevorzugt. Bei Raumtemperatur in Ethanol, jedoch verbunden mit einer sehr langen Reaktionsdauer, entstand fast ausschließlich der Diarylthioether. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Diarylthioether **44p** ein kinetisch kontrolliertes Produkt und das isomere 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion **74a** ein thermodynamisch kontrolliertes Produkt ist.

Um zu prüfen, ob die Konkurrenzreaktion zum 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion auch bei der Umsetzung anderer 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thione **65** mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) auftritt, wurde auf gleiche Weise die Reaktion von **65g** mit **68a** (Schema 4-1) sowie die Reaktion von **65a** mit **68a** untersucht (Schema 4-2). Beide Reaktionen wurden in Ethanol unter Rückfluss durchgeführt und Triethylamin als Base eingesetzt. Es konnte auch bei diesen beiden Reaktionen gezeigt werden, dass im

Reaktionsverlauf zuerst die Thioetherverbindung und mit fortschreitender Reaktion mehr vom Konstitutionsisomer entsteht.



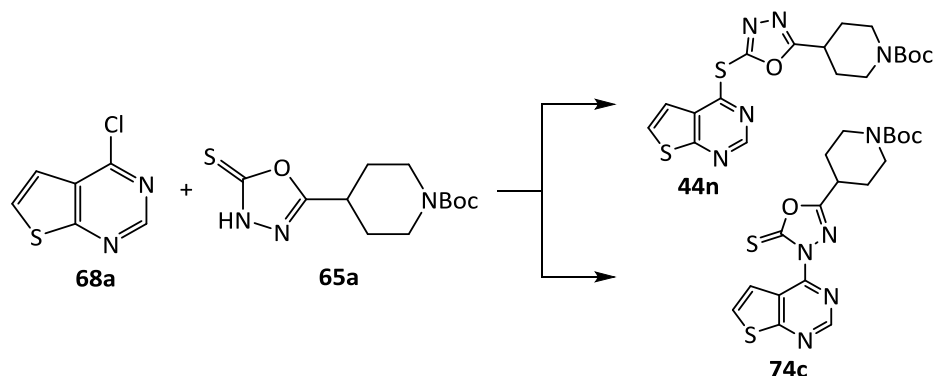
**Schema 4-1:** Reaktion von 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-thion (**65g**) mit 4-Chlorthieno[2,3-d]pyrimidin (**68a**). Dabei kann sowohl der Diarylthioether **44I** als auch das Konstitutionsisomer **74b** entstehen.



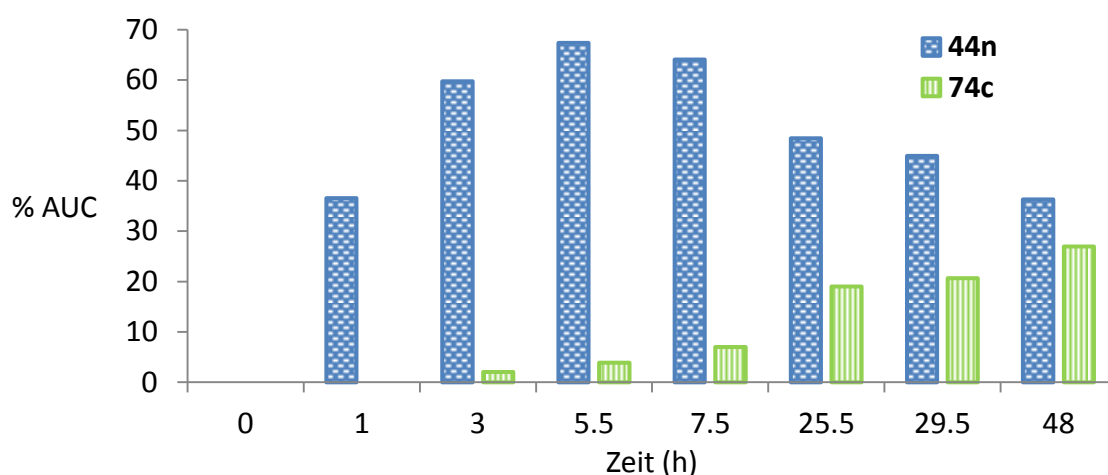
**Abbildung 4-8:** Verlauf der Reaktion von **68a** mit **65g** in Ethanol unter Rückfluss. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44I** (blau) und **74b** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Im Beobachtungszeitraum der Synthese der Isomere **44I** und **74b** war stets die Thioetherverbindung der Hauptbestandteil des Reaktionsgemischs (Abbildung 4-8). War bei der Reaktion des 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-thions (**65e**) mit **68a** innerhalb von 47 Stunden unter gleichen Bedingungen noch deutlich mehr des 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thions entstanden (Abbildung 4-2), so ist hier das vergleichbare **74b** über einen Zeitraum von 48 Stunden nur in geringem Maße entstanden. Es konnte

jedoch auch hier beobachtet werden, dass mit längerer Reaktionszeit der Anteil von **44l** geringer wurde und dafür vermehrt **74b** entstand.



**Schema 4-2:** Reaktion von 4-(5-(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**65a**) mit 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**). Dabei kann sowohl der Diarylthioether **44n** als auch das konstitutionsisomere **74c** entstehen.

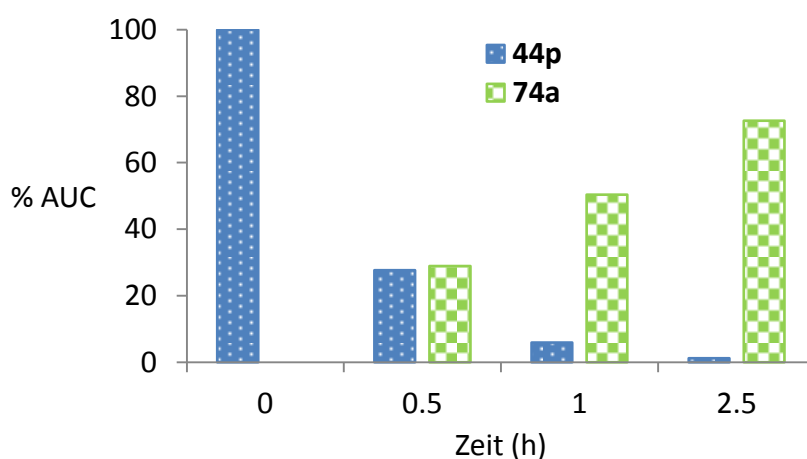


**Abbildung 4-9:** Verlauf der Reaktion von **68a** mit **65a** in Ethanol unter Rückfluss. Prozentuale Anteile (% AUC, durch HPLC ermittelt) der Isomere **44n** (blau) und **74c** (grün) im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Bei der Überprüfung des Reaktionsverlaufs von **68a** mit **65a** zeichnete sich ein ähnliches Bild ab, allerdings war die Bildung des 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thions **74c** innerhalb der 48-stündigen Beobachtungszeit deutlich ausgeprägter als beim vergleichbaren **74b**, jedoch ebenfalls geringer als bei **74a**. Am Ende der Reaktionszeit lagen die Isomere mit Anteilen von 36% (**44n**) und 27% (**74c**) im Reaktionsgemisch vor.

## 4.2 Umwandlung vom kinetischen zum thermodynamischen Produkt

Aus den Verlaufsdiagrammen der durch HPLC untersuchten Reaktionen aus dem vorherigen Abschnitt konnte nicht immer eindeutig entnommen werden, ob die beiden Isomere parallel zueinander entstanden oder ob tatsächlich das kinetisch kontrollierte Produkt in das thermodynamische Produkt umgewandelt wurde. Es wurde deshalb versucht, das isolierte kinetische Produkt ohne die Zugabe weiterer Reagenzien in das thermodynamische Produkt umzuwandeln. In Veröffentlichungen von EL ASHRY *et al.* wurde von einem S-N-Transfer durch Schmelze von S-Glycosyl-2-mercapto-1,3,4-oxadiazolen zu N-Glycosyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thionen berichtet.<sup>130, 131</sup> Der isolierte Reinstoff **44p** wurde deshalb in Anlehnung an diese Publikationen aufgeschmolzen und die zeitlichen Veränderungen der Isomerenverhältnisse per HPLC beobachtet.

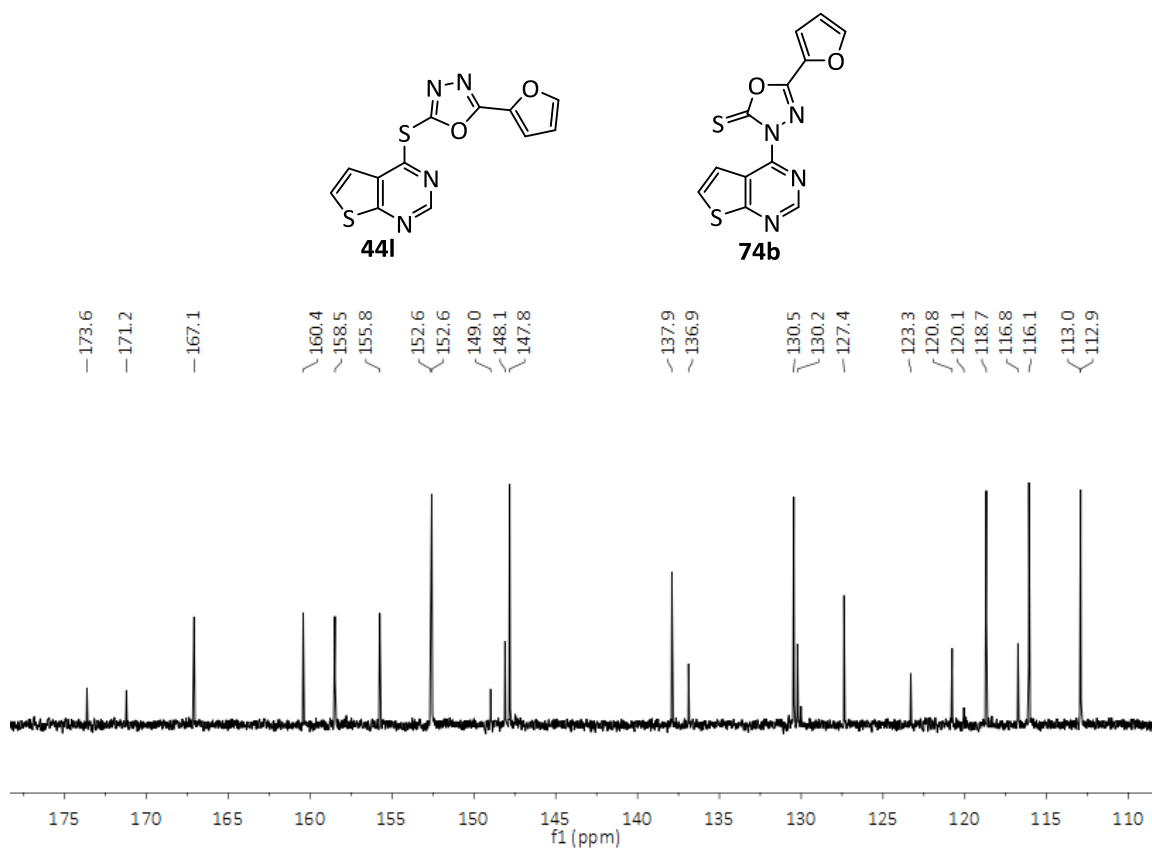


**Abbildung 4-10:** Änderung der prozentualen Anteile (% AUC, ermittelt via HPLC) in der Schmelze des zu Beginn reinen Diarylthioethers **44p** in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Nach 2.5 Stunden in der Schmelze war der Diarylthioether **44p** fast vollständig verschwunden und hatte sich zum Großteil in das isomere **74a** umgewandelt (Abbildung 4-10). Zudem sind einige Nebenprodukte entstanden, wobei es sich möglicherweise um Zersetzungsprodukte handelte, die sich aufgrund der hohen Temperaturen bildeten.

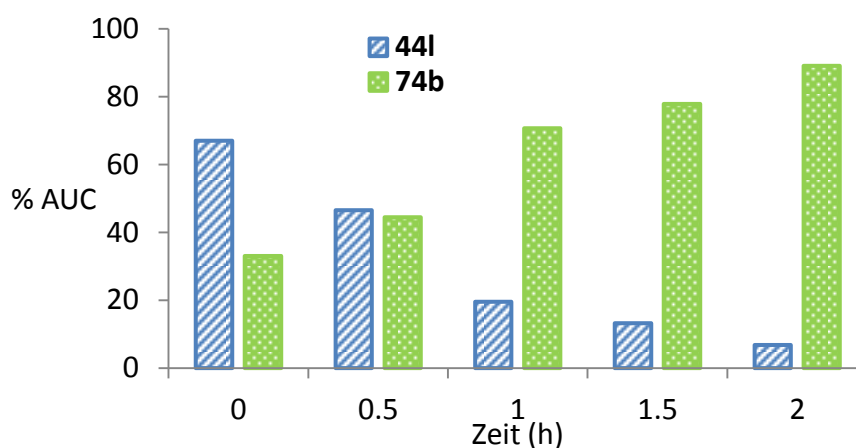
In einem weiteren Experiment wurde ein Gemisch der beiden Konstitutionsisomere **44l** und **74b** analog untersucht. Vor Beginn des Schmelzvorgangs lagen beide Verbindungen in einem Verhältnis von 2:1 zueinander vor. Nach zwei Stunden des Erhitzens bei

Schmelztemperatur lagerte sich der Diarylthioether nahezu vollständig in das 3-substituierte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion um (Abbildung 4-12). NMR-Spektren, die vor und nach der Schmelze aufgenommen wurden, belegen diesen Vorgang (Abbildung 4-11 und Abbildung 4-13).

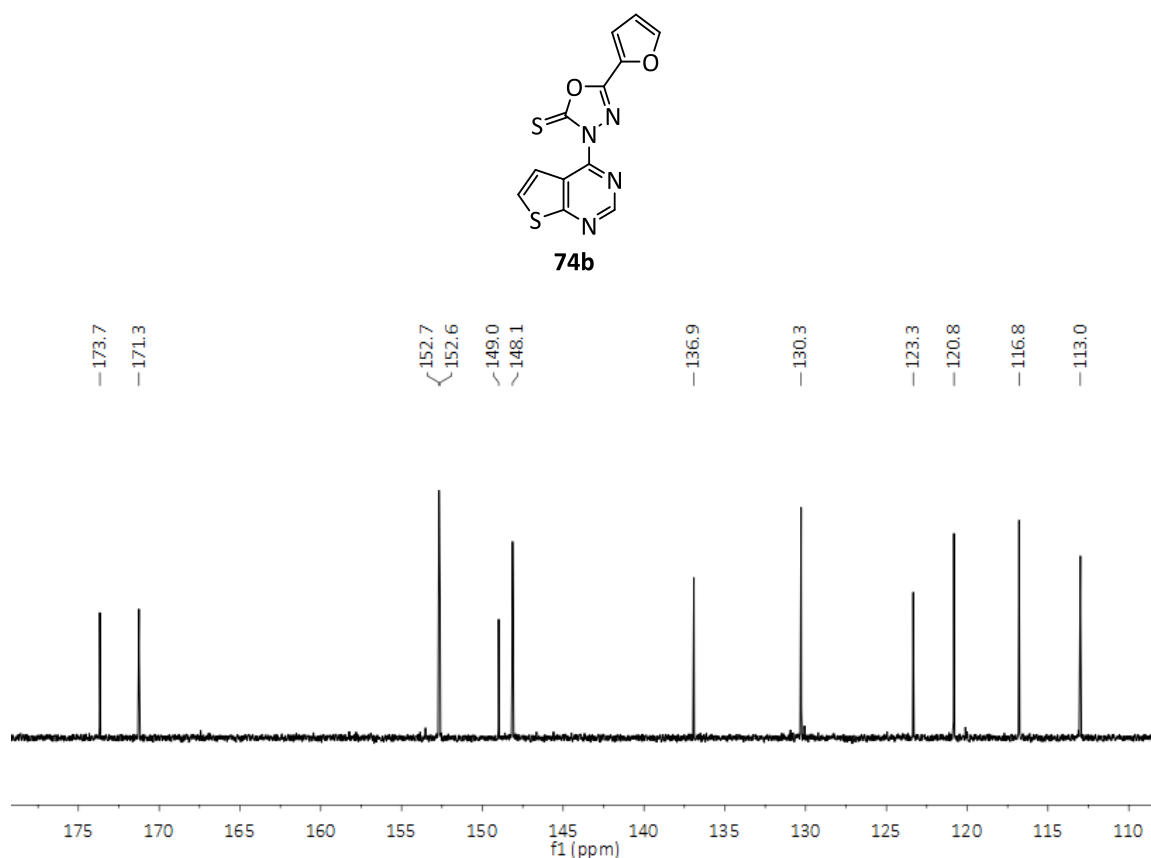


**Abbildung 4-11:** Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums des Gemisches **44I** und **74b** vor dem Schmelzvorgang. Das Spektrum enthält 24 Kohlenstoffsignale, je 12 für jedes der Isomere.



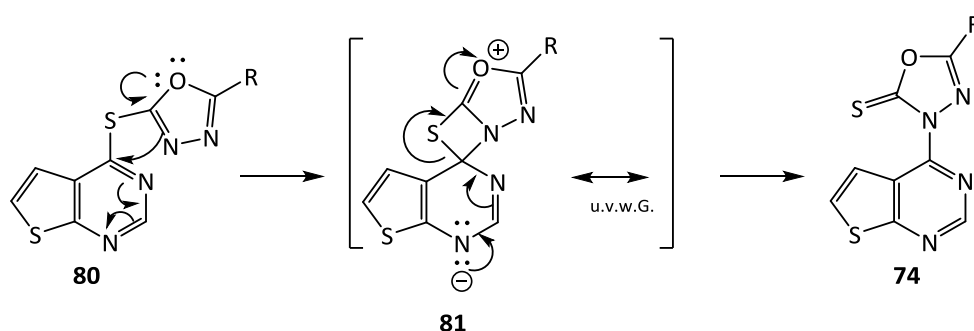


**Abbildung 4-12:** Veränderungen der prozentualen Anteile (% AUC, ermittelt via HPLC) des Isomergemischs **44I** und **74b** während der Schmelze in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.



**Abbildung 4-13:** Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums des Gemisches **44I** und **74b** nach der Schmelze. Im Gemisch ist fast ausschließlich **74b** übrig geblieben. Das Spektrum zeigt 12 deutliche Kohlenstoffsignale. Typisch für die Thiocarbonylstruktur sind Signale über 170 ppm, wie hier bei 171.3 und 173.7 ppm zu sehen. Eines dieser Signale ist das des Thiocarbonylkohlenstoffs.

Im Verlauf der Transformation der Isomere können in den hier vorgestellten Schmelzversuchen die jeweiligen Edukte nicht als Zwischenprodukte fungieren, denn in der mechanistischen Betrachtung der nucleophilen Substitution zum Diarylthioether wird deutlich, dass Chlorid als Abgangsgruppe dient. Dieses bildet mit der zugesetzten Base und einem Proton ein Ammoniumchloridsalz. Es ist also nicht möglich, dass bei der Umlagerung von **44p** zu **74a** oder **44l** zu **74b** 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin als Zwischenprodukt gebildet wird, da kein Chloridion im Reaktionsgleichgewicht mehr vorhanden ist. Die Umlagerung muss also auf eine andere Art und Weise erfolgen. Ein möglicher Vorschlag für den Mechanismus ist in Schema 4-3 dargestellt. Ein viergliedriger Zyklus als Zwischenstufe des Schwefel-Stickstoff-Transfers wird auch von EL ASHRY *et al.* diskutiert.<sup>131</sup>



**Schema 4-3:** Beispiel für einen möglichen Mechanismus der Umlagerung von einem Diarylthioether der Konstitution **80** zum 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2-thion **74** über eine viergliedrige Zwischenstufe (**81**). Mechanismus in Anlehnung an die Formulierung des S-N-Transfers ausgehend von S-Glycosyl-2-mercapto-1,3,4-oxadiazolen von EL ASHRY *et al.*<sup>131</sup>

## 5 Biologische Evaluierung

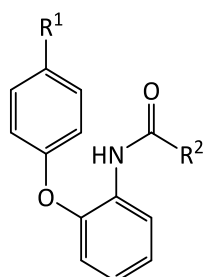
Die in dieser Arbeit synthetisierten Zielverbindungen wurden nach Prüfung der Identität und Reinheit biologisch evaluiert. Es wurden *in vitro*-Assays aller Testverbindungen mit Plasmodien im erythrozytären Stadium von ABED NASEREDDIN in den Laboratorien von RON DZIKOWSKI an der *Hebrew University* von Jerusalem (Israel) durchgeführt. Hierbei wurden transgene NF54-Luc-Parasitenstämme verwendet. Bei diesen ist Luciferase coexprimiert, ein Enzym, das zur Detektion der lebenden Parasiten genutzt wird. Des Weiteren wurde die Toxizität einiger Substanzen gegenüber humanen THP-1-Makrophagen und Mausfibroblasten der Zelllinie 3T3 untersucht. Bei den Untersuchungen von FLETCHER und AVERY über antiplasmodiale Inhibitoren, die mit dem Coenzym A-Metabolismus von Plasmodien interagieren (siehe Abschnitt 1.5), wurde unter anderem eine Hit-Verbindung mit der Grundstruktur **44** entdeckt.<sup>90</sup> Deshalb wurde der Zusammenhang zwischen der Inhibition des Parasitenwachstums durch die aktiven Diarylthioether-Verbindungen dieser Arbeit und dem Metabolismus von Coenzym A in Plasmodien mit Hilfe des von AVERY *et al.* entwickelten Assaysystems untersucht und somit die CoA-Biosynthese als möglicher Wirkort in Betracht gezogen. Bei ausgewählten Verbindungen wurde deshalb überprüft, ob ihre biologische Aktivität gegenüber *P. falciparum* im Zusammenhang mit dem Coenzym A-Biosyntheseweg der Parasiten steht. Die hierzu nötigen Untersuchungen wurden von LEONARDO LUCANTONI in den Laboratorien von VICKY AVERY an der *Griffith University* in Nathan (Australien) durchgeführt. Als Erregerstamm wurde dabei Pf3D7 verwendet, eine Chloroquin-sensitive, ursprünglich von PfNF54 geklonte Plasmodien-Linie.<sup>132</sup> Eine genaue Beschreibung aller Assays ist in Abschnitt 9.4 dargelegt.

### 5.1 Biologische Aktivität der 2-Phenoxyanilide

In Tabelle 5-1 sind die Resultate der biologischen Testung der 2-Phenoxyanilide **43** zusammengefasst. Alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von 3 µM untersucht. Die mit PfNF54-Luc infizierten Erythrozyten wurden bei einer ersten Evaluierung über einen Zeitraum von 48 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen ist dabei überraschend gering ausgefallen.

**43a** ist das Replikat einer Verbindung aus dem TCAMS, die dort im Screening gegen *Pf3D7* sehr gute inhibitorische Werte zeigte. Sie war mit einem approximierten  $IC_{50}$ -Wert von 7 nM sogar eine der aktivsten Verbindungen der Substanzkollektion.<sup>72</sup> In der für diese Arbeit durchgeführten biologischen Testung konnten die Resultate aus der Literatur nicht bestätigt werden. Auch die synthetisierten Derivate **43b–t** zeigten allesamt nur geringe antiplasmodiale Aktivitäten. Aufgrund der unzureichenden Hemmwirkung der 2-Phenoxyanilide im ersten Assay wurden die Kulturen noch einmal für 96 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. So sollten auch langsam wirkende Inhibitoren detektiert werden. Jedoch konnten die untersuchten 2-Phenoxyanilide auch nach längerer Inkubationszeit das Wachstum der Plasmodien nicht signifikant hemmen.

**Tabelle 5-1:** Aktivität der 2-Phenoxyanilide **43** bei 3  $\mu$ M Testkonzentration. Ergebnisse nach 48 Stunden und nach 96 Stunden Inkubationszeit. Als Positivkontrolle wurde Blasticidin S (BS) verwendet.



ID	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% Inhibition nach 48 h <sup>a</sup>	% Inhibition nach 96 h <sup>a</sup>
<b>43a</b>	Cl	1,1-Dimethylethyl	-3.6 ± 4.5	3.4 ± 5.8
<b>43b</b>	Cl	1,1-Dimethylpropyl	7.4 ± 5.0	0.6 ± 5.4
<b>43c</b>	Cl	2-Methylpropyl	10.6 ± 4.0	11.9 ± 7.0
<b>43d</b>	Cl	Ethyl	2.0 ± 2.5	-2.9 ± 7.5
<b>43e</b>	Cl	Cyclopropyl	22.2 ± 1.8	6.8 ± 12.4
<b>43f</b>	Cl	Cyclobutyl	1.4 ± 2.1	3.4 ± 1.3
<b>43g</b>	Cl	Methoxycarbonyl ethyl	6.7 ± 2.6	-1.2 ± 5.5
<b>43h</b>	Cl	4-Methoxyphenyl	9.2 ± 0.6	16.2 ± 8.5
<b>43i</b>	Cl	<i>N</i> -Boc-1-aminomethyl	5.8 ± 1.2	14.4 ± 1.7
<b>43j</b>	Cl	Aminomethyl, Hydrochlorid	-1.6 ± 2.7	2.8 ± 10.9
<b>43k</b>	OCH <sub>3</sub>	1,1-Dimethylethyl	13.2 ± 1.7	5.7 ± 5.3

ID	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% Inhibition nach 48 h <sup>a</sup>	% Inhibition nach 96 h <sup>a</sup>
<b>43l</b>	OCH <sub>3</sub>	1,1-Dimethylpropyl	6.8 ± 4.1	-7.6 ± 3.6
<b>43m</b>	OCH <sub>3</sub>	2-Methylpropyl	18.0 ± 4.3	9.9 ± 10.4
<b>43n</b>	OCH <sub>3</sub>	Ethyl	9.3 ± 3.0	0.8 ± 8.9
<b>43o</b>	OCH <sub>3</sub>	Cyclopropyl	18.3 ± 5.8	-0.6 ± 4.9
<b>43p</b>	OCH <sub>3</sub>	Cyclobutyl	10.3 ± 2.9	31.4 ± 8.6
<b>43q</b>	OCH <sub>3</sub>	Methoxycarbonylethyl	10.9 ± 3.9	-1.6 ± 9.2
<b>43r</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Methoxyphenyl	4.7 ± 1.4	1.4 ± 11.7
<b>43s</b>	OCH <sub>3</sub>	N-Boc-1-aminomethyl	0.3 ± 5.6	7.2 ± 12.7
<b>43t</b>	OCH <sub>3</sub>	Aminomethyl, Hydrochlorid	-4.4 ± 4.9	-16.9 ± 1.3
BS	-	-	100.0 ± 0.0	98.5 ± 0.2

<sup>a</sup> % Inhibition mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM)

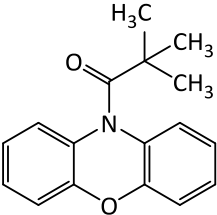
Die insgesamt besten Verbindungen dieser Substanzklasse waren **43e**, welches das Parasitenwachstum nach 48 Stunden Inkubation um 22% reduzierte und **43p**, welches das Parasitenwachstum nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden um 31% reduzierte. Diese Inhibitionswerte sind für einen effektiven Wirkstoff jedoch nicht ausreichend.

Die zuvor erwartete antiplasmodiale Aktivität der 2-Phenoxyanilide konnte mit diesen Assays also nicht nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist beispielsweise das Assaysystem, das sich von jenem unterscheidet, welches von GAMO *et al.*<sup>72</sup> verwendet wurde. Zudem wurden zwei verschiedene Plasmodienstämme verwendet, die jedoch eng miteinander verwandt sind. Für diese Arbeit wurde der transgene Plasmodienstamm NF54-Luc verwendet; GAMO *et al.* nutzten *Pf3D7* für ihren Assay. Es handelt sich bei *Pf3D7* und *PfNF54* um gängige Modelle für die Überprüfung der antiplasmodialen Aktivität von Testsubstanzen. Trotz der Tatsache, dass *Pf3D7* ursprünglich von *PfNF54* kloniert wurde, können sich die Ergebnisse bei beiden Parasitenlinien unterscheiden, zumal in dieser Arbeit ein transgener Erregerstamm von NF54 verwendet wurde. Es wird aber als unwahrscheinlich erachtet, dass ein starker Inhibitor der Proliferation von *Pf3D7* keine Aktivität gegenüber *PfNF54* zeigt. Im Falle der

Diarylthioether **44** inhibierten beispielsweise alle Verbindungen mit antiplasmodialer Aktivität im Luciferase-basierten Assay auch das Parasitenwachstum im Assay mit *Pf3D7*.

Als weitere mögliche Erklärung für das zum Literaturergebnis abweichende Resultat wird in Betracht gezogen, dass im Rahmen der Untersuchungen von GAMO *et al.*<sup>72</sup> eine von **43a** abweichende Verbindung für die Inhibition des Plasmodienwachstums verantwortlich war. In diesem Zusammenhang wurde das Phenoxazinderivat **62** synthetisiert (siehe Abschnitt 3.1.3) und anschließend biologisch getestet. Bei den Untersuchungen gegen Plasmodien des Stamms NF54-Luc konnte für **62** bei einer Testkonzentration von 3  $\mu$ M allerdings keine antiplasmodiale Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 5-2). Der Verdacht einer derartigen Verunreinigung als Verursacher für die antiproliferative Wirkung hat sich demnach nicht bestätigt. Jedoch kann trotzdem die Probe der Verbindung mit der Identifikationsnummer TCMDC-137332 im Rahmen des TCAMS mit einer anderen antiplasmodial aktiven Substanz verunreinigt gewesen sein und deshalb die biologische Aktivität fälschlicherweise mit der Struktur **43a** in Zusammenhang gebracht worden sein.

**Tabelle 5-2:** Ergebnis der biologischen Testung von 2,2-Dimethyl-1-(10*H*-phenoxazin-10-yl)-propan-1-on (**62**) gegen *Pf*NF54-Luc bei 3  $\mu$ M Testkonzentration und 48 h Inkubationszeit.

ID		% Inhibition nach 48 h $\pm$ SEM
<b>62</b>		-1.6 $\pm$ 8.0

## 5.2 Biologische Aktivität der Diarylthioether

### 5.2.1 Antiplasmodiale Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die kommerziell erworbenen Substanzen **44a–m** wurden in Voruntersuchungen bei 30  $\mu\text{M}$  Testkonzentration gegen *Pf*NF54-Luc überprüft. Nahezu alle Verbindungen reduzierten dabei das Parasitenwachstum um mehr als 80%. **44b** ( $26 \pm 2\%$ ) und **44c** ( $37 \pm 4\%$ ) inhibierten die Proliferation in geringem Maße, weshalb diese nicht weiter evaluiert wurden. Alle anderen Substanzen wurden bei 3  $\mu\text{M}$  Testkonzentration ein zweites Mal untersucht. Die Ergebnisse dieser biologischen Testung sind zusammen mit den Ergebnissen der synthetisierten Diarylthioether **44n–s** in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

**Tabelle 5-3:** Antiplasmodiale Aktivität der Diarylthioether **44a–s** mit 2-(Thieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Grundstruktur bei einer Testkonzentration von 3  $\mu\text{M}$ . Als Positivkontrolle wurde Blasticidin S (BS) verwendet.

ID	R <sup>1</sup>	% Inhibition <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
<b>44a</b>		$24.3 \pm 3.2$	nb
<b>44d</b>		$-0.6 \pm 5.4$	nb
<b>44e</b>		$-7.3 \pm 6.9$	nb
<b>44f</b>	2-Chlorphenyl	$1.5 \pm 4.3$	nb
<b>44g</b>	2-Bromphenyl	$-13.1 \pm 9.1$	nb
<b>44h</b>		$-103.3 \pm 4.4$	nb
<b>44i</b>	3-Pyridinyl	$-5.5 \pm 3.8$	nb

ID	R <sup>1</sup>	% Inhibition <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>44j</b>	4-Methylphenyl	-11.0 ± 6.7	nb
<b>44k</b>	4-Ethylphenyl	-7.0 ± 1.8	nb
<b>44l</b>	2-Furanyl	80.8 ± 0.5	0.736
<b>44m</b>	4-Fluorphenyl	-8.3 ± 4.1	nb
<b>44n</b>	<i>N</i> -Boc-Piperidin-4-yl	-0.82 ± 3.11	nb
<b>44o</b>	<i>N</i> -Boc-Aminomethyl	2.28 ± 3.31	nb
<b>44p</b>	<i>tert</i> -Butyl	-14.6 ± 12.9	nb
<b>44q</b>	Hydroxymethyl	-12.3 ± 2.2	nb
<b>44r</b>	Piperidin-4-yl	7.7 ± 1.8	nb
<b>44s</b>	Aminomethyl	-2.8 ± 16.6	nb
BS		99.3 ± 0.7	nb

<sup>a</sup> % Inhibition mit Angabe des SEM; nb: nicht bestimmt

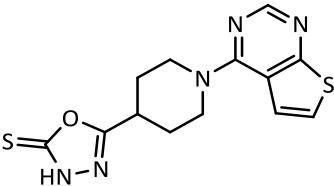
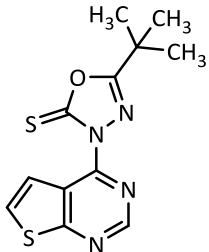
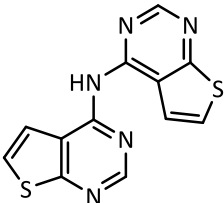
Die eben genannten Verbindungen enthalten alle eine 2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Grundstruktur. Ein Großteil der Substanzen dieser Reihe inhibierte das Wachstum der Parasiten nicht; **44h** schien das Wachstum sogar zu fördern. Einzig das Furanyl-substituierte **44l**, bei dem ein submikromolarer IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt wurde, zeigte eine gute antiplasmodiale Aktivität. **44q**, das im Gegensatz zum rigiden Furanyl-Rest einen flexibleren Hydroxymethyl-Substituenten trägt, enthält einen Sauerstoff in ähnlicher Distanz zum Oxadiazolring wie **44l**, war jedoch völlig inaktiv. Immerhin moderate Wachstumshemmung bewirkte das Sulfonamid **44a**. Die Sulfonamide **44d** und **44e** haben eine ähnliche Struktur wie **44a**, sind jedoch gar nicht aktiv. Das Substitutionsmuster zwischen **44a** und **44l** unterscheidet sich sehr stark, sodass ein direkter Zusammenhang der inhibierenden Wirkung mit der Sulfonamid-Teilstruktur nicht hergestellt werden kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen mit 2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Grundstruktur sind demnach mit Ausnahme von **44l** keine geeigneten Inhibitoren der Proliferation von *P. falciparum*. Das zu **44p** isomere 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion **74a** war ebenso wenig aktiv wie das tertiäre Amin **71**. Das Konstitutionsisomer von **44r** zeigte nur eine marginale proliferationshemmende

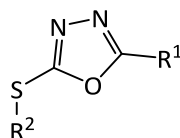


Wirkung gegenüber Plasmodien. Zudem wurde auch das Diarylamin **77** untersucht, wobei auch dieses keine antiplasmodiale Aktivität aufwies.

**Tabelle 5-4:** Ergebnisse der biologischen Testung (Testkonzentration 3  $\mu$ M, Parasitenstamm PfNF54-Luc) von **74a**, **71** und **77**, welche allesamt Verbindungen mit einer von der Grundstruktur **44** abweichenden Konstitution sind.

ID		% Inhibition $\pm$ SEM
<b>71</b>		$4.7 \pm 3.3$
<b>74a</b>		$-19.1 \pm 7.0$
<b>77</b>		$-4.5 \pm 7.9$

Durch den Austausch des Thieno[2,3-*d*]pyrimidins und den Erhalt der 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-Grundstruktur sollte überprüft werden, ob sich die Hemmwirkung im Vergleich zu **44i** veränderte. Sowohl der Ersatz des Thiophenrings gegen einen Pyrrol- (**72a**) oder einen Imidazolring (**72b**) führte zum vollständigen Verlust der antiplasmodialen Aktivität (Tabelle 5-5). Auch das *tert*-Butyl-substituierte **72d** war eher ein Förderer des Parasitenwachstums als ein Inhibitor.

**Tabelle 5-5:** Ergebnisse der biologischen Testung von **72a–d** im Vergleich zu **44l** gegen PfNF54-Luc bei einer Testkonzentration von 3  $\mu$ M.

ID	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% Inhibition <sup>a</sup>
<b>72a</b>	Furan-2-yl	Pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-4-yl	-24.8 $\pm$ 13.6
<b>72b</b>	Furan-2-yl	Imidazo[4,5- <i>d</i> ]pyrimidin-7-yl	1.79 $\pm$ 2.53
<b>72c</b>	Furan-2-yl	2-Cyanpyrazin-3-yl	0.98 $\pm$ 1.52
<b>72d</b>	<i>tert</i> -Butyl	2-Aminopyrimidin-4-yl	-23.4 $\pm$ 6.8
<b>44l</b>	Furan-2-yl	Thieno[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-4-yl	80.8 $\pm$ 0.5

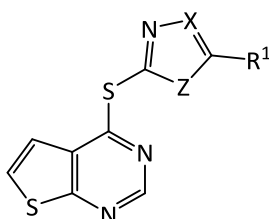
<sup>a</sup> % Inhibition mit Angabe des SEM

Den bisher beschriebenen Ergebnissen der biologischen Evaluierung ist zu entnehmen, dass ausschließlich **44l** antiplasmodiale Aktivität zeigte und sowohl die vorgenommenen Änderungen des Substitutionsmusters am 1,3,4-Oxadiazol, als auch der Wechsel von der Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Grundstruktur zu anderen Heteroaromaten einen Verlust der inhibitorischen Wirkung verursachte. Aus den genannten Gründen wurden weitere Verbindungen synthetisiert, bei welchen die 1,3,4-Oxadiazol-Teilstruktur gegen andere Heteroaromaten ausgetauscht und die Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Teilstruktur beibehalten wurde.

Tabelle 5-6 fasst die Ergebnisse der biologischen Evaluierung der Diarylthioether **44t–y**, die unterschiedliche Fünfring-Heterozyklen enthalten, zusammen. **44t** unterscheidet sich von **44l** nur durch das NH, das anstelle des Oxadiazol-Sauerstoffs eingeführt wurde. Der Wechsel vom 1,3,4-Oxadiazol zum 1,2,4-Triazol führte jedoch zu einer Minderung der antiplasmodialen Aktivität. Ein Wasserstoffbrückendonator ist an dieser Position offensichtlich weniger geeignet als ein Wasserstoffbrückenakzeptor. Die Reduktion der Molekülgröße hin zu **44u** bewirkte einen kompletten Verlust der Aktivität. Der Austausch der Triazol-Teilstruktur gegen eine Imidazol-Teilstruktur (**44v**) sorgte jedoch für eine starke Verbesserung der Hemmwirkung. **44v** konnte das Parasitenwachstum bei 3  $\mu$ M Inhibitorkonzentration nahezu vollständig unterbinden. Es ist mit einem IC<sub>50</sub>-Wert

von 0.675  $\mu\text{M}$  ein guter Inhibitor des Wachstums der *Pf*NF54-Luc Parasiten. Eine weitere Verbesserung der Aktivität wurde mit dem Thiazol-Derivat **44w** erreicht, das die Proliferation mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.434  $\mu\text{M}$  inhibierte. Ein noch besseres Ergebnis wurde mit dem Oxazol-Derivat **44x** erzielt, für das ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.382  $\mu\text{M}$  bestimmt wurde. **44x** ist in dieser Reihe, in der die mit Z benannte Position im Molekül von N-CH<sub>3</sub> zu S und O variiert wurde, die antiplasmodial aktivste Verbindung und auch gleichzeitig das Molekül mit der geringsten relativen Molmasse. Das Thiadiazol-Derivat **44y** ist ebenfalls ein passabler Inhibitor der Proliferation von *Pf*NF54-Luc. Es wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1.07  $\mu\text{M}$  bestimmt. Auffällig ist in dieser Reihe von Molekülen (**44t–y**), dass jene Verbindungen ohne Heteroatom an Position X potentere Inhibitoren des plasmodialen Wachstums sind, als die Verbindungen, die ein Stickstoffatom in dieser Position enthalten. Als allgemeine Regel kann dies jedoch nicht postuliert werden, da **44l** ein Stickstoffatom in dieser Position enthält und ebenfalls ein guter Inhibitor ist.

**Tabelle 5-6:** Antiplasmodiale Aktivität der Diarylthioether **44t–y** im Screening gegen *Pf*NF54-Luc bei einer Testkonzentration von 3  $\mu\text{M}$ .



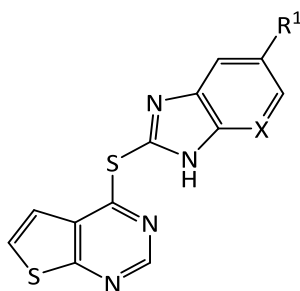
ID	X	Z	R <sup>1</sup>	% Inhibition <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
<b>44t</b>	N	NH	Furan-2-yl	33.2 $\pm$ 6.8	nb
<b>44u</b>	N	N-CH <sub>3</sub>	H	4.7 $\pm$ 2.6	nb
<b>44v</b>	CH	N-CH <sub>3</sub>	H	96.5 $\pm$ 1.6	0.675
<b>44w</b>	CH	S	H	99.9 $\pm$ 0.0	0.434
<b>44x</b>	CH	O	H	99.5 $\pm$ 0.5	0.382
<b>44y</b>	N	S	NH <sub>2</sub>	99.7 $\pm$ 0.1	1.07

<sup>a</sup> % Inhibition mit Angabe des SEM; nb: nicht bestimmt

Neben den schon diskutierten Fünfring-Heterozyklen wurden auch unterschiedlich substituierte Benzimidazole (**44z–44ac**) und ein Imidazopyridin (**44ad**) als Ersatz für den

1,3,4-Oxadiazolring in die Diarylthioether-Grundstruktur eingeführt. Die Ergebnisse des Screenings gegen *Pf*NF54-Luc Parasiten und der Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration sind in Tabelle 5-7 beschrieben.

**Tabelle 5-7:** Antiplasmodiale Aktivität von **44z–ad** bei einer Testkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  im Screening gegen *Pf*NF54-Luc.

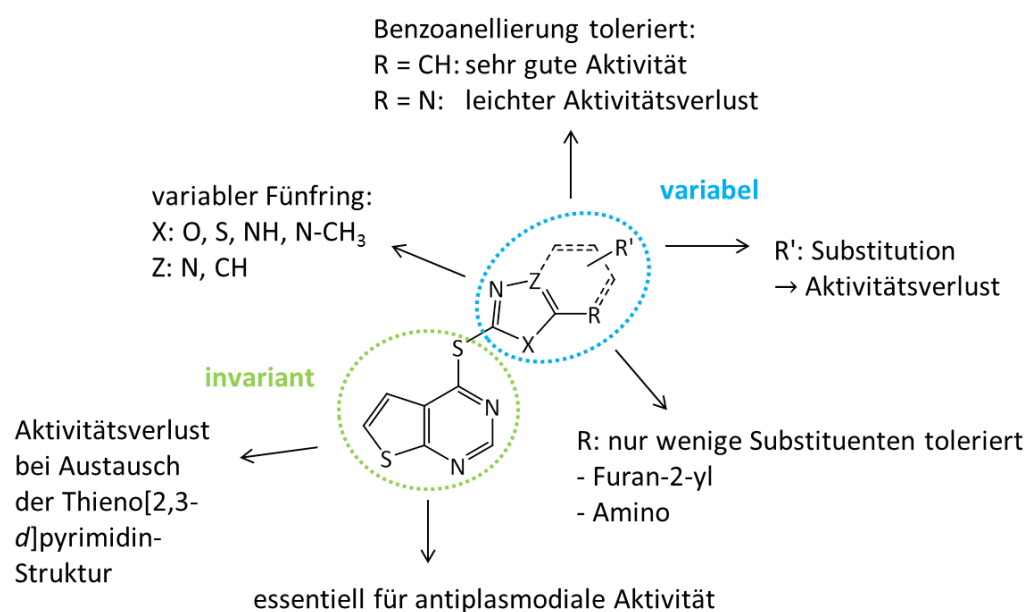


ID	X	R <sup>1</sup>	% Inhibition <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
<b>44z</b>	CH	H	95.0 $\pm$ 1.1	0.190
<b>44aa</b>	CH	CH <sub>3</sub>	-1.9 $\pm$ 5.3	nb
<b>44ab</b>	CH	Cl	-18.4 $\pm$ 10.6	nb
<b>44ac</b>	CH	OCH <sub>3</sub>	-36.3 $\pm$ 10.6	nb
<b>44ad</b>	N	H	98.0 $\pm$ 0.2	0.305

<sup>a</sup> % Inhibition mit Angabe des SEM; nb: nicht bestimmt

Das unsubstituierte Benzimidazol **44z** inhibierte das Parasitenwachstum bei der getesteten Inhibitorkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  fast vollständig. Bei der genaueren Evaluation der Substanz wurde ein sehr guter IC<sub>50</sub>-Wert von 0.190  $\mu\text{M}$  bestimmt, was gleichbedeutend mit dem besten Resultat aller Verbindungen dieser Arbeit ist. Die Ergebnisse der substituierten Benzimidazole **44aa**, **44ab** und **44ac** zeigten hingegen, dass durch Einführung von Resten in 5-Position des Benzimidazols der vollständige Verlust der antiplasmodialen Aktivität resultiert. Es wird in Betracht gezogen, dass die Bindetasche der bisher unbekannten Zielstruktur dieser Substanzklasse in dieser Position nur ein bedingtes Platzangebot bietet, weshalb die Substituenten zum Aktivitätsverlust von **44aa–ac** führen könnten. Ein weiteres Stickstoffatom im Sechsring, wie bei **44ad**, wurde jedoch sehr gut toleriert. Das Imidazopyridin ist nach **44z** die Verbindung mit dem niedrigsten IC<sub>50</sub>-Wert gegenüber *Pf*NF54. Es inhibierte das Wachstum der Parasiten bei einer Konzentration von 0.305  $\mu\text{M}$  halbmaximal.

Die von den Ergebnissen aller biologisch untersuchten Substanzen abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen deuten darauf hin, dass neben der Thioether-Grundstruktur die Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Teilstruktur ein wesentlicher Bestandteil für die antiplasmodiale Wirkung ist. Die andere Seite der Thioether-Brücke kann mit unterschiedlichen Fünfring-Heteroaromaten besetzt sein, die zudem auch benzoanelliert sein können. Zusätzliche Substituenten heben jedoch mit wenigen Ausnahmen die Hemmwirkung der Diarylthioether-Testverbindungen auf (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1:** Struktur-Wirkungsbeziehungen der Diarylthioether-Testverbindungen.

Im Rahmen des Coenzym A-Substitutions-Assays (siehe Abschnitt 5.2.2) wurden die antiplasmodial aktiven Diarylthioether gegen Erreger des Plasmodienstamms *Pf3D7* untersucht. In diesem Assay, bei dem Parasiten im Ringstadium verwendet wurden, konnte die Hemmwirkung der Verbindungen aus dem Luciferase-basierten Assay (*Pf*NF54-Luc) bestätigt werden. Die einzelnen Inhibitionswerte unterschieden sich jedoch (Tabelle 5-8). Mit Ausnahme von **44v** fielen die IC<sub>50</sub>-Werte bei den Untersuchungen an *Pf3D7* um den Faktor 2–11 niedriger aus. Vor allem bei **44y**, das das Wachstum von *Pf*NF54-Luc bei einer Konzentration von 1.07 µM halbmaximal inhibierte, war mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 96 nM gegenüber *Pf3D7* der Unterschied deutlich. Außerdem war auch **44w** bei der Untersuchung gegen *Pf3D7* um den Faktor 11 aktiver und damit die

Verbindung mit dem niedrigsten  $IC_{50}$ -Wert (39 nM). Alle weiteren Resultate bewegten sich in einem ähnlichen Bereich wie im Luciferase-basierten Assay. *In summa* konnte somit mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Assaysystemen, die verschiedene Parasitenlinien nutzten und völlig unabhängig voneinander durchgeführt wurden, die antiplasmodiale Aktivität dieser Diarylthioether bestätigt werden.

**Tabelle 5-8:** Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte der antiplasmodial aktiven Diarylthioether aus zwei Assays mit unterschiedlichen Parasitenlinien (*Pf*NF54-Luc und *Pf*3D7).

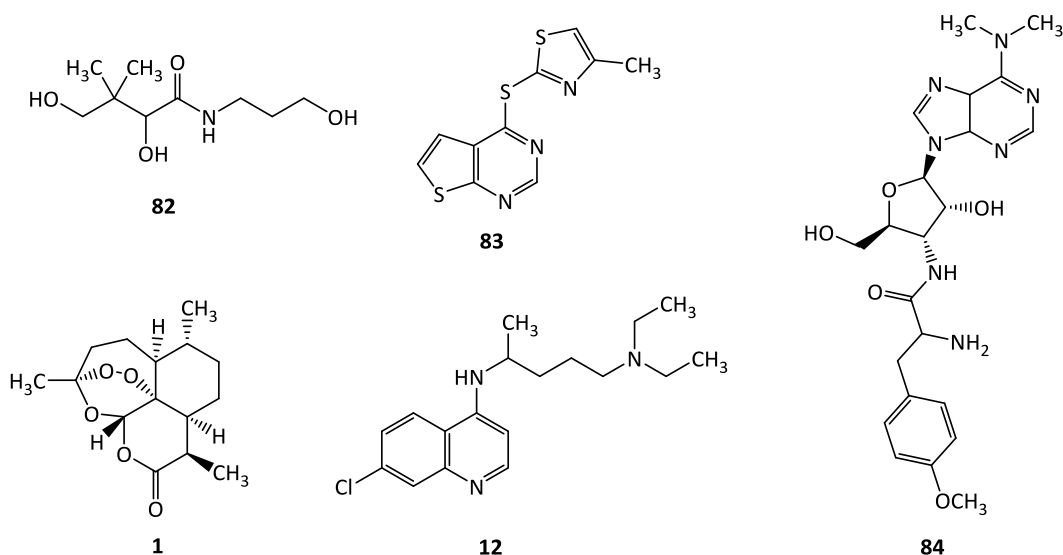
ID	$IC_{50}$ (NF54-Luc) [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ (3D7) [ $\mu$ M]
<b>44l</b>	0.736	0.283
<b>44v</b>	0.675	1.26
<b>44w</b>	0.434	0.0388
<b>44x</b>	0.382	0.0747
<b>44y</b>	1.07	0.0958
<b>44z</b>	0.190	0.0734
<b>44ad</b>	0.305	0.149

### 5.2.2 Ergebnisse des Coenzym-A-Substitutions-Assays

Der Coenzym A-Metabolismus von Plasmodien stellt ein mögliches Target für antiparasitäre Wirkstoffe dar. Es sollte überprüft werden, ob die mit Hilfe des Luciferase-basierten *in vitro*-Assays gefundene antiproliferative Aktivität der Diarylthioether mit der Inhibition von Proteinen des CoA-Metabolismus in Zusammenhang steht. Hierzu wurden die in Tabelle 5-8 aufgelisteten aktiven Verbindungen, sowie zusätzlich die Diarylthioether **44t** und **44u**, in einem Coenzym-A-Substitutions-Assay untersucht.

Bei diesem Assay wurden wie von FLETCHER und AVERY beschrieben zwei parallel laufende Testreihen durchgeführt, in welchen für jede Verbindung jeweils Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt wurden, d. h. für jede Verbindung wurden insgesamt zwei Dosis-Wirkungs-Kurven unter zwei unterschiedlichen Bedingungen erstellt.<sup>90</sup> In 384-*well*-Platten wurden erythrozytäre Parasiten des Plasmodienstamms 3D7, die sich im Ringstadium befanden, in einer Versuchsreihe ausschließlich mit den Testverbindungen inkubiert. In der zweiten

Testreihe wurden die Proben jeweils zusätzlich mit einer 0.8 mM Coenzym-A-Lösung versetzt und ebenfalls inkubiert. Mit der ersten Testreihe wurde also auf übliche Weise der  $IC_{50}$ -Wert der Verbindungen gegenüber *Pf3D7* bestimmt. Mit der zweiten Testreihe wurde überprüft, inwieweit die Hemmwirkung der Substanz durch Zugabe von Coenzym A aufgehoben wurde. Sollte demnach eine Substanz ein oder mehrere Proteine des CoA-Metabolismus inhibieren, würden die Parasiten aufgrund des entstehenden Mangels an CoA sterben. Durch die Substitution mittels exogen zugeführtem Coenzym A sollte dieser Mangel wieder ausgeglichen werden und die inhibitorische Wirkung der Substanz aufgehoben werden. Coenzym A alleine führt nicht zum vermehrten Wachstum von Plasmodien.<sup>90</sup>



**Abbildung 5-2:** Referenzsubstanzen für den Coenzym-A-Substitutions-Assay: Pantothenol (**82**), Amb180780 (**83**), Artemisinin (**1**), Chloroquin (**12**), Puromycin (**84**).

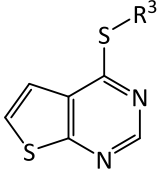
Als Referenzsubstanzen (Abbildung 5-2) wurden Pantothenol (**82**) und der Diarylthioether Amb180780 (**83**) verwendet. Die antiplasmodiale Wirkung beider Verbindungen wurde bereits mit einer Störung des CoA-Metabolismus in Verbindung gebracht.<sup>90</sup> Zudem wurden die bekannten Antimalariawirkstoffe Artemisinin (**1**) und Chloroquin (**12**) sowie das Antibiotikum Puromycin (**84**), deren Wirkmechanismen unabhängig vom CoA-Metabolismus sind, als Referenzen verwendet. Die getesteten Referenzsubstanzen ergaben die jeweils erwarteten Inhibitionswerte, womit die Güte des Assays belegt werden konnte. Zudem zeigte sich, dass weder bei Artemisinin (**1**)

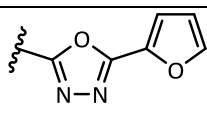
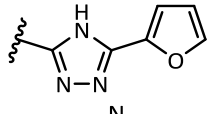
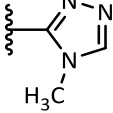
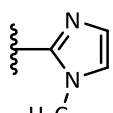
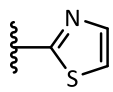
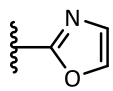
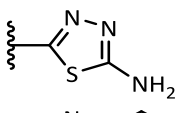
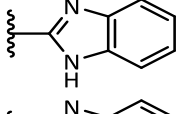
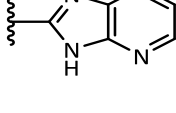
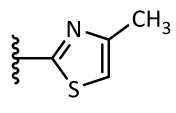
oder Chloroquin (**12**), noch bei Puromycin (**84**) die Hemmwirkung durch Coenzym A beeinflusst wurde. Hierdurch wird verdeutlicht, dass alleine die Zugabe von Coenzym A nicht zur Aufhebung der Inhibition des Parasitenwachstums führt.

Von den neun untersuchten Diarylthioethern dieser Arbeit konnte bei sieben eine deutliche Verringerung (> 5-fach) der Hemmwirkung durch die Zugabe der 0.8 mM CoA-Lösung beobachtet werden (Tabelle 5-9). Die weniger potenten **44t** und **44v** inhibierten die Plasmodienproliferation in der Testreihe mit CoA-Zugabe mit ähnlichen  $IC_{50}$ -Werten wie in der Testreihe ohne CoA-Zugabe. Allerdings waren auch bei Substanzen mit relativ geringer antiplasmodialer Aktivität deutliche Effekte im Coenzym-A-Assay zu beobachten. Sowohl beim schwachen Inhibitor **44u** als auch bei Pantothenol (**82**), welches eine sehr niedrige antiplasmodiale Aktivität besitzt, konnte eine sieben- bzw. eine mehr als 13-fache Erhöhung des  $IC_{50}$ -Werts beobachtet werden. Die im niedrigen nanomolaren Bereich liegende Hemmwirkung von **44z** und **44ad** könnte im Zusammenhang mit einer Inhibition von Proteinen des CoA-Metabolismus stehen. Für beide Substanzen ergab sich eine etwa siebenfache Erhöhung der Inhibitionswerte durch die Addition von Coenzym A. Das Oxadiazolderivat **44l** ist ebenfalls ein potenter Inhibitor des Wachstums von *Pf3D7*. Die Hemmwirkung wurde durch die Zugabe von CoA deutlich reduziert (16-fach). Der größte Einfluss der CoA-Zugabe wurde jedoch bei **44w**, **44x** und vor allem bei **44y** beobachtet. Die beiden unsubstituierten Azole **44w** und **44x** sind Amb180780 (**83**) nicht nur strukturell ähnlich, sondern haben auch eine vergleichbare antiplasmodiale Aktivität. Der Einfluss der Zugabe des Coenzym A auf den  $IC_{50}$ -Wert von **44w** und **44x** wird graphisch durch die deutliche Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven verbildlicht (Abbildung 5-3). Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Amb180780 (**83**) zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 5-4, rechts), wobei der Quotient der  $IC_{50}$ -Werte mit einem Wert von 40.8 zwischen dem von **44w** (67.3) und **44x** (34.5) liegt. Der scheinbar stärkste Inhibitor des Coenzym-A-Metabolismus ist das Thiadiazol **44y**, dessen Dosis-Wirkungs-Kurve sich durch die Addition von CoA am stärksten nach rechts verschob (Abbildung 5-4, links). Die Hemmwirkung wurde insgesamt um das 117-Fache verringert.

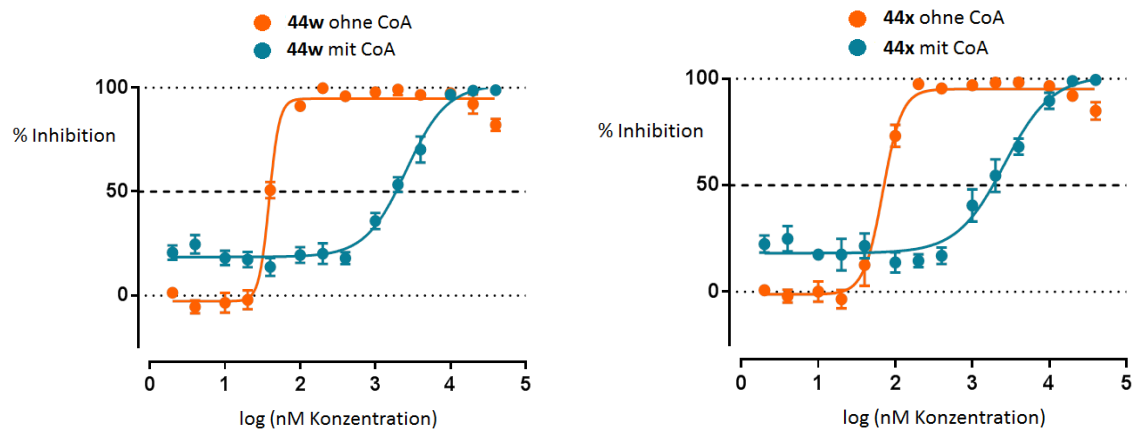


**Tabelle 5-9:** Ergebnisse des CoA-Substitutions-Assays. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte ohne CoA (IC<sub>50</sub> (3D7)) und mit CoA-Zugabe (IC<sub>50</sub> (+CoA)).

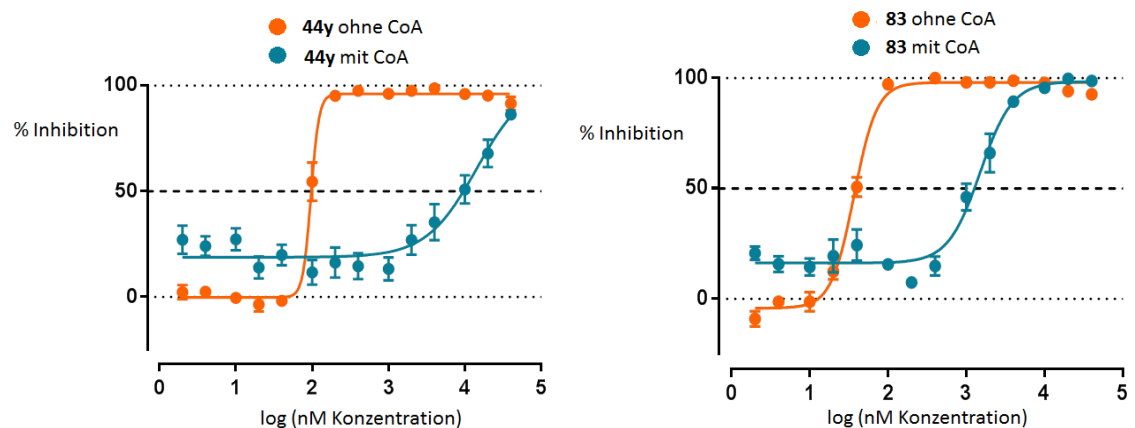


ID	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (3D7) <sup>a</sup> [μM]	IC <sub>50</sub> (+CoA) <sup>a</sup> [μM]	IC <sub>50</sub> (+CoA) / IC <sub>50</sub> (3D7)
<b>44l</b>		0.283 ± 0.073	4.61 ± 0.15	16.3
<b>44t</b>		10.5 ± 1.1	16.1 ± 2.2	1.53
<b>44u</b>		5.37 ± 1.0	39.7 ± 0.7	7.39
<b>44v</b>		1.26 ± 0.16	2.31 ± 0.17	1.83
<b>44w</b>		0.0388 ± 0.0010	2.61 ± 0.42	67.3
<b>44x</b>		0.0747 ± 0.021	2.58 ± 0.42	34.5
<b>44y</b>		0.0958 ± 0.0063	11.2 ± 2.6	117
<b>44z</b>		0.0734 ± 0.0022	0.531 ± 0.007	7.23
<b>44ad</b>		0.149 ± 0.021	1.06 ± 0.03	7.11
<b>1<sup>b</sup></b>	-	0.00337 ± 0.00065	0.00490 ± 0.0011	1.45
<b>12<sup>b</sup></b>	-	0.0195 ± 0.0034	0.0271 ± 0.0094	1.39
<b>82<sup>b</sup></b>	-	752 ± 82	> 10000	> 13.3
<b>83</b>		0.0370 ± 0.0017	1.51 ± 0.19	40.8
<b>84<sup>b</sup></b>	-	0.0338 ± 0.012	0.0939 ± 0.0016	2.78

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Wert mit Angabe des SEM; <sup>b</sup> siehe Abbildung 5-2



**Abbildung 5-3:** Inhibition der Plasmodien-Linie 3D7. Dosis-Wirkungs-Kurven mit (blau) und ohne (orange) Zugabe von Coenzym A. Links: **44w**. Rechts: **44x**.



**Abbildung 5-4:** Inhibition der Plasmodien-Linie 3D7. Dosis-Wirkungs-Kurven mit (blau) und ohne (orange) Zugabe von Coenzym A. Links: **44y**. Rechts: Amb180780 (**83**).

Insgesamt wurde also durch die Addition von Coenzym A bei fast allen antiplasmodial aktiven Diarylthioethern dieser Arbeit die Hemmwirkung deutlich verringert. Der Einfluss der CoA-Zugabe, der aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Testverbindungen mit Amb180780 (**83**) vermutet wurde, konnte somit mit Hilfe dieses Assays bestätigt werden. Die Verringerung der Inhibitionswerte ist ein guter Hinweis für den Zusammenhang der antiparasitären Aktivität der untersuchten Diarylthioether mit einer Störung des Coenzym A-Metabolismus von Plasmodien. Vor allem bei **44w** und **44y**, bei welchen der Effekt durch die Zugabe von Coenzym A am stärksten zu beobachten war, scheint dies der Fall zu sein. Bei beiden war der Einfluss der CoA-Substitution sogar noch deutlicher als bei Amb180780 (**83**). Es ist deshalb denkbar, dass die antiplasmodiale

Wirkweise von **44w** und **44y** spezifischer als bei den restlichen Testverbindungen mit dem Coenzym-A-Metabolismus in Zusammenhang steht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind allerdings kein abschließender Beweis, dass es sich bei den Wirkorten dieser Diarylthioether tatsächlich um Proteine der CoA-Biosynthese, des Pantothenat-Transports oder um Proteine anderer unter dem Einfluss von Coenzym A stehender Stoffwechselprozesse handelt. Hierfür müssten weitergehende Untersuchungen mit diesen Proteinen durchgeführt werden, was aufgrund des jetzigen Standes der Forschung in diesem Gebiet noch nicht möglich ist. Einige der Diarylthioether haben jedoch das Potential, bei der weiteren Erforschung des Biosyntheseweges von Coenzym A in Plasmodien nützlich zu sein.

### 5.2.3 Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests

Neben der antiproliferativen Aktivität gegen Plasmodien wurde auch die toxische Wirkung gegenüber einer humanen Monozytenzelllinie (THP-1) überprüft (Tabelle 5-10). Für diese Untersuchung wurden jedoch nur die Verbindungen mit guter antiplasmodialer Aktivität ausgewählt. Zudem wurde für **44v** und **44z** auch die Zytotoxizität gegenüber murinen Fibroblastenzellen (3T3) getestet (Tabelle 5-11). Aus den  $IC_{50}$ -Werten, die sich bei den Toxizitätstests ergaben, und den  $IC_{50}$ -Werten aus den Untersuchungen an Plasmodien wurde durch Quotientenbildung der Selektivitätsindex (SI) der jeweiligen Substanz bestimmt. Je höher der SI ausfällt, desto selektiver ist die antiparasitäre Wirkung einer Substanz. Der hier ermittelte SI ist somit ein erstes Indiz für die Sicherheit einer Substanz gegenüber den Wirtszellen. Bei allen untersuchten Verbindungen war die antiparasitäre Aktivität stärker als die antiproliferative Wirkung gegenüber THP-1 oder 3T3. Da fast alle Substanzen eine höhere antiplasmodiale Potenz gegen *Pf3D7* besitzen, fiel der SI dort meist höher aus als der analoge Wert für *PfNF54*.

**Tabelle 5-10:** Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests gegenüber THP-1-Zellen im Vergleich mit der antiparasitären Aktivität.

ID	IC <sub>50</sub> , NF54 [μM]	IC <sub>50</sub> , 3D7 [μM]	IC <sub>50</sub> , THP-1 [μM]	SI <sub>THP-1/NF54</sub> <sup>a</sup>	SI <sub>THP-1/3D7</sub> <sup>b</sup>
<b>44l</b>	0.736	0.283	6.13	8	22
<b>44v</b>	0.675	1.26	> 300	> 444	> 238
<b>44w</b>	0.434	0.0388	27.5	63	709
<b>44x</b>	0.382	0.0747	33.6	88	450
<b>44y</b>	1.07	0.0958	11	10	115
<b>44z</b>	0.190	0.0734	16.5	87	225
<b>44ad</b>	0.305	0.149	28	92	188

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>, THP-1 / IC<sub>50</sub>, NF54; <sup>b</sup> IC<sub>50</sub>, THP-1 / IC<sub>50</sub>, 3D7

**Tabelle 5-11:** Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests gegenüber 3T3-Zellen im Vergleich mit der antiparasitären Aktivität.

ID	IC <sub>50</sub> , NF54 [μM]	IC <sub>50</sub> , 3D7 [μM]	IC <sub>50</sub> , 3T3 [μM]	SI <sub>3T3/NF54</sub> <sup>c</sup>	SI <sub>3T3/3D7</sub> <sup>d</sup>
<b>44v</b>	0.675	1.26	212	314	168
<b>44z</b>	0.190	0.0734	> 300	> 1579	> 4087

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub>, 3T3 / IC<sub>50</sub>, NF54; <sup>d</sup> IC<sub>50</sub>, 3T3 / IC<sub>50</sub>, 3D7

Als besonders geringfügig toxische Substanz ist **44v** hervorgetreten, das sowohl die humanen Monozytenzellen als auch die murinen Fibroblastenzellen nur bei sehr hoher Konzentration abtötete. **44v** war jedoch im Vergleich auch eine weniger potente antiplasmodiale Verbindung. Das gegenüber *Pf*NF54 besonders aktive Benzimidazol-derivat **44z** ist im Vergleich zu **44v** schon bei geringeren Konzentrationen toxisch für THP-1-Zellen. Der SI von 87 zeigt jedoch, dass die antiparasitäre Potenz immer noch deutlich ausgeprägter ist als die Toxizität gegenüber THP-1. Bei den Untersuchungen an 3T3-Zellen ging von **44z** keine messbare Zytotoxizität aus. Das davon abgeleitete Imidazopyridin **44ad** hat ein vergleichbares Selektivitätsprofil. Neben einer guten antiparasitären Wirksamkeit zeigt es ebenfalls nur eine geringe Zytotoxizität (THP-1). Sowohl das Thiazol-Derivat **44w** als auch das analoge Oxazol **44x** vereinen eine sehr gute

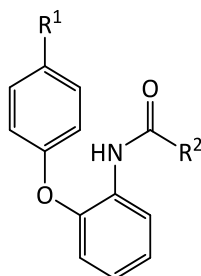
antiplasmodiale Aktivität mit einer geringen Toxizität. Beim Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte gegen *Pf3D7* und jener gegen THP-1, zeigen beide Substanzen bemerkenswerte Selektivitätsindices. Aufgrund ihres Sicherheitsprofils, das zukünftig noch detaillierter evaluiert werden sollte, sind **44w** und **44x** vielversprechende Verbindungen für weiterführende biologische Untersuchungen.

## 6 Physikochemische Eigenschaften

Im Entwicklungsprozess von neuen Arzneistoffen spielen die physikochemischen Eigenschaften, wie beispielsweise die Lipophilie und die Löslichkeit der Wirkstoffkandidaten, eine wichtige Rolle, da diese unter anderem die Aufnahme und Verteilung eines Wirkstoffs im Körper beeinflussen und somit auch dessen Wirksamkeit, Effektivität und Sicherheit mitbestimmen.<sup>133</sup> Leitverbindungen, die aus Hit-Strukturen eines HTS hervorgingen und rational weiterentwickelt wurden, sind in vielen Fällen während ihrer Entwicklung größer und lipophiler geworden und damit schlechter oral bioverfügbar.<sup>103, 134</sup> Ein Grund dafür ist, nach Meinung von LIPINSKI, häufig die Einführung von lipophilen Gruppen, die die Bindungsaffinität zur Zielstruktur erhöhen sollen.<sup>134</sup> Um die orale Bioverfügbarkeit eines Moleküls schon in der frühen Entwicklung abschätzen zu können, wurde von LIPINSKI *et al.* eine Faustregel entwickelt, die sogenannte *rule of five* (Ro5). Hiernach sollen Substanzen, die eine relative Molmasse von höchstens 500 Dalton, eine maximale Anzahl von fünf Wasserstoffbrückendonatoren und zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren im Molekül enthalten, sowie einen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log P$ ) von 5 nicht überschreiten, eine gute orale Bioverfügbarkeit besitzen.<sup>103</sup> Der  $\log P$  ist dabei ein Kriterium für die Lipophilie einer Verbindung. Je lipophiler ein Molekül ist, desto geringer wird seine Löslichkeit in wässrigem Medium sein. Voraussetzung für die pharmakologische Wirkung einer Substanz nach oraler Applikation ist jedoch ein Mindestmaß an Löslichkeit im wässrigen Milieu des Gastrointestinaltraktes.<sup>135</sup> Demzufolge kann eine zu geringe Wasserlöslichkeit ein Kriterium für den Misserfolg eines Kandidaten in der pharmazeutischen Entwicklung sein.<sup>136</sup> Transportsysteme für schwerlösliche Wirkstoffe können zur Verbesserung der Pharmakokinetik beitragen. Die Entwicklung solcher Formulierungen ist jedoch aufwändig und mit erhöhten Kosten verbunden. Deshalb ist es relevant, die pharmakokinetischen Eigenschaften schon in einer frühen Phase der Wirkstoffentwicklung zu beachten. Von einigen der aktiven Verbindungen dieser Arbeit wurden die Löslichkeitseigenschaften bestimmt. Zudem wurden mehrere Substanzen mit Hilfe der Ro5-Kriterien beurteilt.

## 6.1 Ro5-Eigenschaften der 2-Phenoxyanilide

Ausgehend von **43a** wurden 19 weitere Derivate mit der allgemeinen Struktur **43** synthetisiert. Fast alle dieser Verbindungen erfüllen die Kriterien von LIPINSKIS Ro5 vollständig<sup>103</sup> (Tabelle 6-1). Die relative Molmasse der synthetisierten 2-Phenoxyanilide liegt jeweils weit unterhalb der Grenze von 500 Dalton. Zudem sind maximal sieben Wasserstoffbrückenakzeptoren und maximal vier Wasserstoffbrückendonatoren in den jeweiligen Molekülen vorhanden. Die Lipophilie wurde mit Hilfe des vorhergesagten log P-Werts ausgedrückt. Bei der Ausgangsverbindung **43a** beträgt der vorhergesagte log P-Wert 5.11 und ist somit etwas oberhalb des von LIPINSKI *et al.*<sup>103</sup> gesetzten Grenzwerts von 5. Durch den Austausch der lipophilen *tert*-Butylgruppe durch Cycloalkylreste oder durch die Einführung polarer Gruppen in die Seitenkette konnte der log P-Wert gesenkt werden. Zudem führte auch der Austausch des Chlorsubstituenten gegen die Methoxygruppe zu einer Senkung des log P-Werts. Das entscheidende Kriterium, die biologische Aktivität, konnten die Verbindungen dieser Substanzklasse jedoch trotz guter physikochemischer Eigenschaften in Bezug auf die Regeln von LIPINSKI nicht erfüllen.

**Tabelle 6-1:** Eigenschaften der 2-Phenoxyanilide **43** nach den Kriterien von LIPINSKIS Ro5.

ID	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	H <sub>A</sub>	H <sub>D</sub>	log P <sup>a</sup>	M <sub>r</sub>
<b>43a</b>	-Cl	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3	1	5.11	303.79
<b>43b</b>	-Cl	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	1	5.56	317.81
<b>43c</b>	-Cl	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	1	4.75	303.79
<b>43d</b>	-Cl	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	1	4.02	275.73
<b>43e</b>	-Cl	-Cyclopropyl	3	1	4.10	287.74
<b>43f</b>	-Cl	-Cyclobutyl	3	1	4.54	301.77
<b>43g</b>	-Cl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	5	1	3.29	333.77
<b>43h</b>	-Cl	4-Methoxyphenyl	4	1	5.01	353.80
<b>43i</b>	-Cl	-CH <sub>2</sub> NH-Boc	6	2	3.88	376.84
<b>43j</b>	-Cl	-CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	3	4	2.39	276.72
<b>43k</b>	-OCH <sub>3</sub>	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4	1	4.35	299.37
<b>43l</b>	-OCH <sub>3</sub>	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4	1	4.80	313.40
<b>43m</b>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4	1	3.99	299.37
<b>43n</b>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4	1	3.25	271.32
<b>43o</b>	-OCH <sub>3</sub>	-Cyclopropyl	4	1	3.33	283.33
<b>43p</b>	-OCH <sub>3</sub>	-Cyclobutyl	4	1	3.78	297.35
<b>43q</b>	-OCH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	6	1	2.52	329.35
<b>43r</b>	-OCH <sub>3</sub>	4-Methoxyphenyl	5	1	4.25	349.39
<b>43s</b>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> NH-Boc	7	2	3.12	372.42
<b>43t</b>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	4	4	1.63	272.30

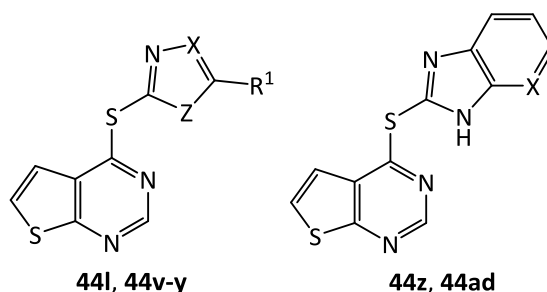
<sup>a</sup> log P wurde mit chemicalize.org vorhergesagt<sup>137</sup>



## 6.2 Physikochemische Eigenschaften einiger Diarylthioether

In der vorliegenden Arbeit wurden für einige Substanzen die Löslichkeitseigenschaften in Anlehnung an ein von WÖLFEL konzipiertes Verfahren bestimmt.<sup>138</sup> Dabei wurde die thermodynamische Löslichkeit ( $S_{0, \text{exp}}$ ) mit der sogenannten *shake flask* Methode und anschließender Vermessung mittels HPLC bestimmt. Die genaue Beschreibung der Durchführung ist in Abschnitt 9.3 erklärt. Die Substanzproben, die im Überschuss vorlagen, wurden mit einer Phosphatpufferlösung (pH 7.4) unter Schütteln inkubiert. Dabei stellte sich mit der Zeit ein Gleichgewicht zwischen Feststoff und Lösung ein, sodass die Löslichkeit der thermodynamisch stabilsten Form ermittelt wurde. Es wurden Aliquote der Probenfiltrate entnommen und mit isokratischen Methoden an der HPLC vermessen. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor (DAD). Die Proben wurden bei der für die Substanz spezifischen maximalen Absorptionswellenlänge vermessen und aus dem Chromatogramm die Fläche unter dem Substanzsignal (% AUC) ermittelt. Damit aus den Chromatogrammen der Proben die Löslichkeit bestimmt werden konnte, wurden zusätzlich für jede Substanz Kalibrierlösungen mit definierter Konzentration in DMSO-Acetonitril-Gemischen vermessen. Hiermit wurden Kalibrationsgeraden erstellt, bei welchen die Fläche unter dem Substanzsignal (% AUC) gegen die korrespondierende Konzentration aufgetragen wurde.

Um mögliche Korrelationen zu betrachten, wurde den experimentell bestimmten Löslichkeitsdaten die Lipophilie der einzelnen Verbindungen in Form der vorgesagten log P-Werte gegenüber gestellt. Die gesammelten Ergebnisse sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst.

**Tabelle 6-2:** Löslichkeitseigenschaften und Lipophilie (log P) ausgewählter Diarylthioether.

ID	X	Z	R <sup>1</sup>	S <sub>0, exp</sub> [μM]	log S <sub>0, exp</sub>	log P <sup>a</sup>
<b>44l</b>	N	O	Furan-2-yl	< 1.0 <sup>b</sup>	< -6.00	2.83
<b>44v</b>	CH	N-CH <sub>3</sub>	H	1.78 · 10 <sup>3c</sup>	-2.75	2.87
<b>44w</b>	CH	S	H	36.4 <sup>d</sup>	-4.44	3.42
<b>44x</b>	CH	O	H	1.33 · 10 <sup>3d</sup>	-2.88	2.70
<b>44y</b>	N	S	NH <sub>2</sub>	4.4 <sup>d</sup>	-5.36	2.39
<b>44z</b>	CH	-	-	0.43 <sup>c</sup>	-6.37	4.05
<b>44ad</b>	N	-	-	77.0 <sup>d</sup>	-4.11	3.15

<sup>a</sup> log P wurde mit chemicalize.org<sup>137</sup> bestimmt; <sup>b</sup> Minimale Konzentration, die für **44l** mittels HPLC/UV detektiert werden konnte; <sup>c</sup> Gleichgewichtseinstellung nach 48 h; <sup>d</sup> Gleichgewichtseinstellung nach 24 h.

Die thermodynamische Löslichkeit wurde für sieben Verbindungen bestimmt. Besonders hervorzuheben sind die Ergebnisse der Diarylthioether **44v** und **44x**, die sehr gute Löslichkeitseigenschaften zeigten. Beide Verbindungen lösten sich mit millimolarer Konzentration in der wässrigen Pufferlösung und waren somit im Vergleich wesentlich besser löslich als die anderen untersuchten Diarylthioether. **44w** unterscheidet sich nur durch ein Schwefelatom an der mit Z bezeichneten Position von **44x**, jedoch war die untersuchte Löslichkeit bei **44x** um das 37-fache besser. Schon beim log P, der für **44x** bei 2.70 und für **44w** bei 3.42 liegt, deutete sich dieser Unterschied in der Löslichkeit an. Die Lipophilie ist allerdings nicht das einzige Kriterium für die Löslichkeit in wässrigem Medium, wie das Beispiel des Thiadiazolderivats **44y** zeigt. Für dieses wurde ein log P von 2.39 vorhergesagt, jedoch nur eine Löslichkeit von 4.4 μM ermittelt. Neben der Lipophilie spielt beispielsweise auch die Gitterenergie der Festsubstanz eine Rolle im

Lösungsprozess. Je fester das Kristallgitter einer Substanz ist, desto schwerer geht diese in der Regel in Lösung. Die Gitterenergie korreliert wiederum mit dem Schmelzpunkt. Der Zusammenhang zwischen Schmelzpunkt und Löslichkeit wird auch in einer von YALKOWSKI beschriebenen Gleichung dargelegt:<sup>139, 140</sup>

$$\log S_w^{\text{solid}} = 0.5 - 0.01(MP - 25) - \log K_{ow}$$

Hierbei ist  $S_w^{\text{solid}}$  die vorhergesagte Löslichkeit eines Feststoffs in wässrigem Milieu,  $MP$  der Schmelzpunkt, angegeben in °C und  $K_{ow}$  der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Substanz.<sup>140</sup> **44y** geht erst bei 219–220 °C in die Flüssigphase über. Der hohe Schmelzpunkt kann also eine Erklärung für die schlechte Löslichkeit dieser Verbindung sein. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei **44l**, dessen vorhergesagter log P-Wert auf einem Niveau mit dem sehr gut löslichen **44v** liegt. Die experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit des Furanyl-Derivats (< 1 µM) lag jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze für diese Substanz. Das äußerst potente Benzimidazolderivat **44z** ist neben **44l** in der Reihe die Verbindung mit der schlechtesten Löslichkeit. Sowohl die Lipophilie (log P = 4.05) als auch der Schmelzbereich (217–220 °C) von **44z** sind ungünstig, was die geringe Löslichkeit erklärt. Die Einführung eines Stickstoffatoms bei dessen Derivat **44ad** führte zu einer signifikanten Steigerung der Wasserlöslichkeit um zwei Größenordnungen. Bereits die Erniedrigung des Schmelzpunktes (187–188 °C) und der prognostizierten Lipophilie (log P = 3.15) deuteten das verbesserte Ergebnis an.

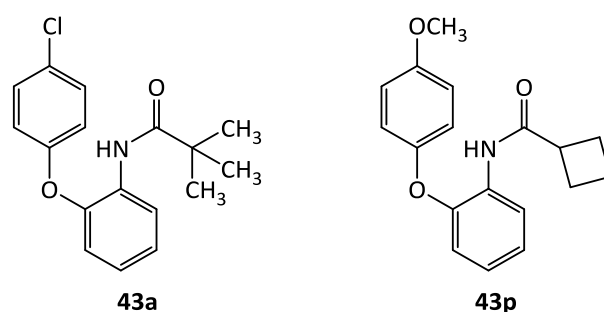
Die Resultate von **44l** und **44z** zeigen, dass die antiplasmodiale Aktivität in der *in vitro*-Untersuchung nicht zwangsläufig von einer guten Löslichkeit in wässrigem Medium abhängig ist. Für die weitere Entwicklung eines Wirkstoffs ist jedoch eine bessere Löslichkeit erwünscht. Eine Löslichkeit > 60 µg/mL in wässrigem Milieu wird in der Wirkstoffentwicklung für klinische Kandidaten als geeignet erachtet.<sup>141</sup> Dieser Richtwert entspricht einer Konzentration von etwa 200 µM bei Molekülen mit einer molaren Masse von ca. 300 Da und wird in der Reihe der Testsubstanzen vom Imidazol **44v** und vom Oxazol **44x** deutlich überschritten.

Ein Bezug zwischen den Löslichkeitseigenschaften der Verbindungen dieser Reihe und der jeweiligen Struktur lässt sich mit Einschränkungen herstellen. Mit Ausnahme des Thiadiazols **44y** und des Furanyl-Derivats **44l** korreliert die vorausgesagte Lipophilie gut mit den experimentell bestimmten Löslichkeitsdaten, d. h. je größer der vorhergesagte log P-Wert ist, desto schlechter löslich ist die entsprechende Verbindung.

## 7 Zusammenfassung

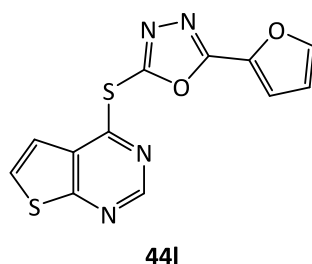
Malaria ist eine von Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufene Infektionskrankheit. Die Resistenzbildung des Erregers gegenüber bekannten Antimalariawirkstoffen ist eine zunehmende Bedrohung für die zukünftige Behandlung der Erkrankung, weshalb die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen dringend notwendig ist. Literaturbekannte Verbindungen, die bei großangelegten Screening-Kampagnen entdeckt wurden<sup>72, 74</sup>, dienten in der hier vorgelegten Arbeit als Vorbilder zur Findung neuer antiplasmodial aktiver Substanzen. Es wurden zwei Verbindungsklassen bearbeitet: Diarylether mit einer 2-Phenoxyanilid-Grundstruktur (**43**) und Diarylthioether, die von 4-(Arylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidinen **44** abgeleitet wurden. Es wurden verschiedene neue Derivate synthetisiert, vollständig charakterisiert und für die biologischen Untersuchungen bereitgestellt. Zudem wurden wichtige Nebenprodukte bei der Synthese von Diarylthioethern mit 1,3,4-Oxadiazol-Grundstruktur identifiziert und deren Entstehung durch Beobachtung des Reaktionsverlaufs analysiert.

Das 2-Phenoxyanilid **43a** (Abbildung 7-1) ist eine literaturbekannte Verbindung, die bei einem breit angelegten Screening als antiplasmodial identifiziert und daher dem TCAMS (*Tres Cantos Antimalarial Compound Set*) hinzugefügt worden war. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **43a** konnten bei im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Analogsubstanzen die für die orale Bioverfügbarkeit relevanten physikochemischen Parameter verbessert werden. Für die unabhängig nachsynthetisierte Substanz **43a** konnte die erwartet gute Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* jedoch nicht reproduziert werden. Die antiplasmodiale Aktivität war, genau wie bei den davon abgeleiteten Derivaten **43b–t**, nicht bis nur gering ausgeprägt. Das 2-Phenoxyanilid mit der besten Hemmwirkung war **43p** (Abbildung 7-1), das bei einer Testkonzentration von 3 µM das Parasitenwachstum nach 96 h um 31% reduzierte.



**Abbildung 7-1:** Die 2-Phenoxylanilide **43a** und **43p**.

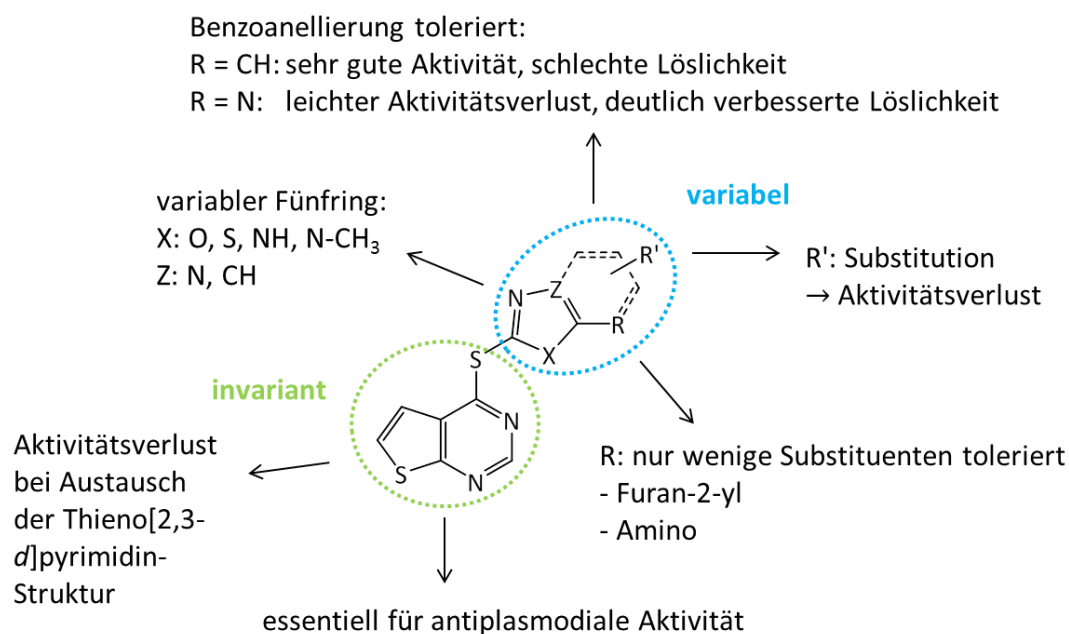
Bei einem Screening kommerziell verfügbarer Testsubstanzen mit einer 5-Aryl-2-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-Grundstruktur auf antiplasmodiale Aktivität wurde Verbindung **44l** als Hit identifiziert (Abbildung 7-2). Die anderen kommerziell erworbenen Substanzen sowie weitere synthetisierte Analogverbindungen hemmten die Proliferation der Plasmodien nicht oder nur marginal.



**Abbildung 7-2:** Der als antiplasmodiale Hit-Verbindung identifizierte Diarylthioether **44l**.

Um die Relevanz der Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Teilstruktur für die antiplasmodiale Wirkung zu überprüfen, wurden ähnliche elektronenarme Heteroaromaten mit 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion verknüpft. Die so erhaltenen Derivate **72a–c** waren jedoch inaktiv. Die Synthese weiterer 4-Arylthiothieno[2,3-*d*]pyrimidine **44**, die unterschiedliche Fünfring-Heteroaromaten enthielten, brachte mehrere antiplasmodial wirksame Verbindungen hervor, deren antiparasitäre Aktivität in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Proliferationsassays mit Plasmodien der Stämme NF54-Luc bzw. 3D7 nachgewiesen werden konnte. Bei Betrachtung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen stellte sich die essentielle Rolle der Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-Teilstruktur für

das Pharmakophor heraus. Auf der anderen Seite der Thioether-Brücke wurde hingegen ein breiteres Spektrum von Heteroaromaten toleriert (Abbildung 7-3).

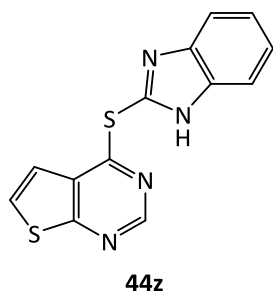


**Abbildung 7-3:** Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Diarylthioether **44**.

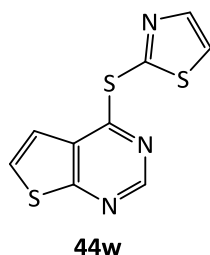
Das Benzimidazol **44z** hemmte das Wachstum von *Pf*NF54-Luc am stärksten ( $IC_{50}$  = 0.190  $\mu$ M) und war gleichzeitig nur wenig toxisch gegenüber THP-1- und 3T3-Zellen. Die Proliferation von *Pf*3D7 wurde am stärksten vom Thiazol **44w** gehemmt ( $IC_{50}$  = 0.0388  $\mu$ M), welches ebenfalls nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber THP-1-Monozyten zeigte (Abbildung 7-4). Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Löslichkeitseigenschaften der biologisch aktiven Testverbindungen. **44w** und **44ad** waren mit zweistellig mikromolarer Konzentration immerhin moderat im wässrigen Milieu löslich. Das Imidazol **44v** mit 1.78 mM und das Oxazol **44x** mit 1.33 mM zeigten sogar gute Löslichkeitseigenschaften.

Durch Vergleich der Struktur der aktiven Diarylthioether mit literaturbekannten Verbindungen wurde der antiplasmodiale Diarylthioether Amb180780 identifiziert, dessen Hemmwirkung mit dem Coenzym A-Metabolismus von *P. falciparum* in Zusammenhang steht.<sup>90</sup> Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Amb180780 wurde

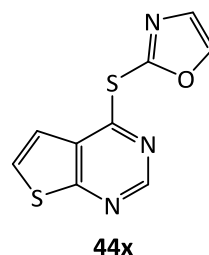
der Coenzym A-Stoffwechsel als möglicher Wirkort für die antiplasmodialen Diarylthioether-Testverbindungen dieser Arbeit in Betracht gezogen. Ebendies wurde in einem von LEONARDO LUCANTONI durchgeführten Coenzym-A-Substitutions-Assay für sieben (**44l**, **44u**, **44w–z**, **44ad**) der neun untersuchten Substanzen nachgewiesen.



$IC_{50}$  (NF54-Luc) = 0.190  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (3D7) = 0.0734  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (THP-1) = 16.5  $\mu$ M  
 $S_{0, \text{exp}}$  (pH 7.4) = 0.43  $\mu$ M



$IC_{50}$  (NF54-Luc) = 0.434  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (3D7) = 0.0388  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (THP-1) = 27.5  $\mu$ M  
 $S_{0, \text{exp}}$  (pH 7.4) = 36.4  $\mu$ M



$IC_{50}$  (NF54-Luc) = 0.382  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (3D7) = 0.0747  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  (THP-1) = 33.6  $\mu$ M  
 $S_{0, \text{exp}}$  (pH 7.4) = 1.33 mM

**Abbildung 7-4:** Verbindungen dieser Arbeit mit besonders guten biologischen Eigenschaften.

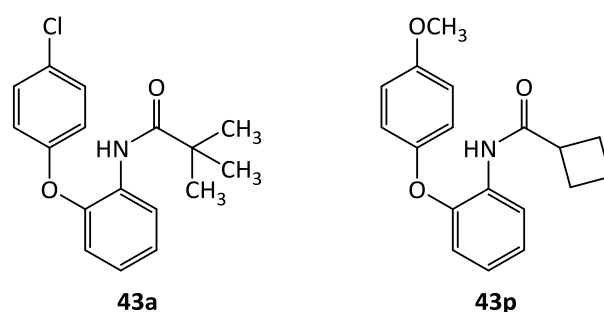
Als besonders wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist das Oxazol-Derivat **44x** hervorzuheben, das eine antiplasmodiale Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich mit einer guten thermodynamischen Löslichkeit (> 1 mM) im wässrigen Milieu vereint (Abbildung 7-4). Zudem inhibiert **44x** die Proliferation humaner THP-1-Zellen erst im zweistellig mikromolaren Bereich und zeigt somit ein gutes Selektivitätsprofil. **44x** ist damit ein guter Kandidat für weiterführende biologische Untersuchungen.



## 8 Summary

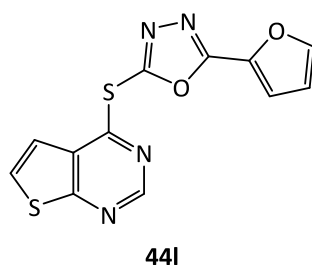
Malaria is an infectious disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*. Emerging resistance against known antimalarials is an increasing threat for the treatment of the disease. Hence there is an urgent need for the development of novel antiplasmodial active compounds. To find new antiparasitic compounds, in this study two different substance classes were derived from hit structures of phenotypic screening campaigns documented in literature<sup>72, 74</sup>: Diaryl ethers with a 2-phenoxyanilide structure (**43**) and diaryl thioethers with a 4-(arylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidine structure (**44**). Several congeners were synthesized, completely characterized and provided for biological evaluation. Furthermore important side products of the synthesis of diaryl thioethers with 1,3,4-oxadiazole structure were identified and their development was analyzed by observation of the reaction process.

The 2-phenoxyanilide **43a** (Figure 8-1) is a substance known from literature, which was identified in a large-scale screening campaign as antiplasmodially active and therefore was added to the TCAMS (Tres Cantos Antimalarial Compound Set). 2-Phenoxyanilide derivatives synthesized in the course of this study were further optimized with regard to physicochemical properties relevant for oral bioavailability compared to the starting compound **43a** by introducing polar groups into the structure. However, it was neither possible to reproduce the expected good antiplasmodial activity for the independently resynthesized **43a** nor for the congeners **43b–t**, which inhibited the growth of *P. falciparum* only marginally. **43p** (Figure 8-1), the 2-phenoxyanilide with the best antiplasmodial activity in this study, diminished the parasite growth by 31% after 96 h at a test concentration of 3  $\mu$ M.



**Figure 8-1:** The 2-phenoxyanilides **43a** and **43p**.

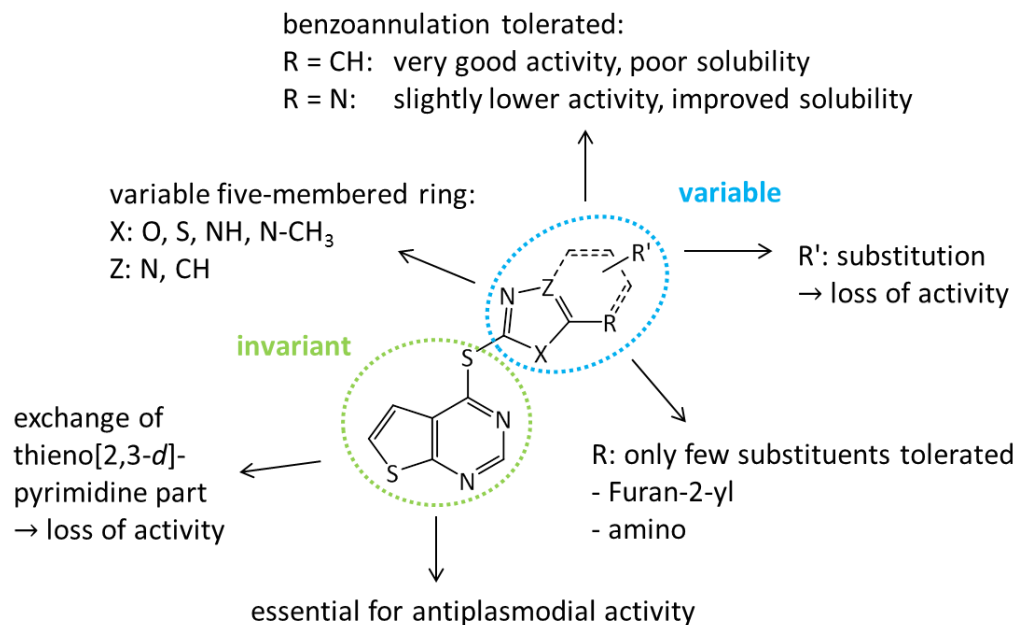
In a screening for antiplasmodial activity of commercially available substances with a 5-aryl-2-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazole scaffold, compound **44l** was identified as hit structure (Figure 8-2). The other purchased compounds and further synthesized congeners at most marginally inhibited the proliferation of *Plasmodium*.



**Figure 8-2:** The antiplasmodial hit structure **44l**.

To investigate the relevance of the thieno[2,3-*d*]pyrimidine fragment for the biological activity, heteroaromatic structures, similar to thieno[2,3-*d*]pyrimidine, were combined with 5-(furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thione. However, the resulting compounds **72a–c** were completely inactive. The synthesis of further 4-(arylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidines **44** with a variety of five-membered heteroaromatic substituents, resulted in several antiplasmodial active compounds. The antiparasitic activity of these substances was proven by two independently performed proliferation assays with parasites of the plasmodial strains NF54-Luc and 3D7, respectively. Establishment of structure-activity-relationships led to the conclusion that the thieno[2,3-*d*]pyrimidine scaffold is an essential part of the pharmacophore for antiplasmodial activity. The

heteroaromatic structure on the other side of the thioether linkage is more variable (Figure 8-3).

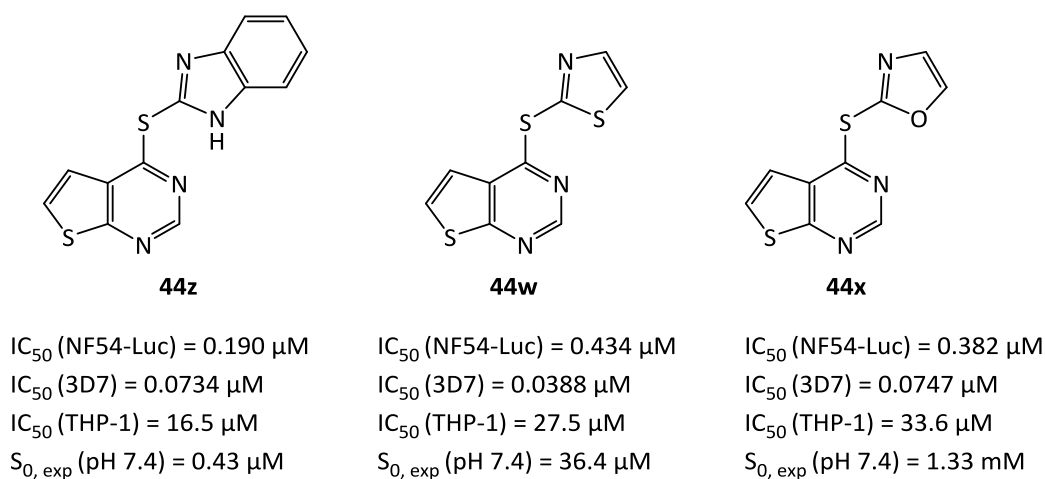


**Figure 8-3:** Structure-activity-relationships of diaryl thioethers.

The benzimidazole **44z** was the most active inhibitor of *Pf*NF54-Luc growth ( $IC_{50}$  = 0.190  $\mu$ M) and moreover showed only low toxicity towards the human THP-1 cell line and murine 3T3-cells. The proliferation of *Pf*3D7 was most inhibited by the thiazole **44w** ( $IC_{50}$  = 0.0388  $\mu$ M), which also showed low toxicity towards THP-1-cells (Figure 8-4). Another important goal of this study was the analysis of solubility parameters of the biologically active test compounds. **44w** and **44ad** were considerably soluble in aqueous buffer with final concentrations in the double-digit micromolar range. Good solubility in the milimolar range was determined for the imidazole **44v** (1.78 mM) and the oxazole **44x** (1.33  $\mu$ M).

By comparison of the structure of the biologically active compounds with structures from literature, the antiplasmodial diaryl thioether Amb180780 was identified. Its mode of action is based on the inhibition of coenzyme A metabolism of *P. falciparum*. Because of the structural similarity of Amb180780, inhibition of proteins related to the CoA-metabolism was considered as a possible mechanism for the antiplasmodial activity of

the diaryl thioether test compounds of this study. This hypothesis was verified for seven out of nine tested compounds (**44l**, **44u**, **44w–z**, **44ad**) with an established coenzyme A supplementation assay performed by LEONARDO LUCANTONI.



**Figure 8-4:** Compounds of this study with particular good biological properties.

A particular important outcome of this study is the oxazole **44x**. It combines antiparasmodial activity in the lower nanomolar range with good solubility properties (> 1 mM) in aqueous media (Figure 8-4). Because rather high concentrations (double-digit micromolar) are needed to inhibit the proliferation of human THP-1-cells, **44x** exhibits an advantageous selectivity profile. In total **44x** is a very promising compound for further biological investigation.

## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Geräte und Methoden

#### Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC-1 für isokratische Elution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300 (eingestellt auf 40 °C), Diode-Array-Detector L-2450, Organizer Box L-2000, Trennsäule: Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

HPLC-2 für Gradienten-Elution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, UV-Detektor L-2400, Organizer Box L-2000, Trennsäule: Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

HPLC-3 für Gradienten-Elution (wurde zur Reaktionskontrolle der Schmelzproben verwendet, sowie in wenigen weiteren Ausnahmen, was an entsprechender Stelle vermerkt ist): Chromaster: Pump 5110, Auto Sampler 5260, Column Oven 5310 (40 °C), Diode-Array-Detector 5430, Trennsäule: Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. VWR/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: Etwa 0.5 mg der Probensubstanz wurden in 300-400 µL DMSO gelöst und durch ein Mini-UniPrep™-Filter (Whatman) filtriert. Das Absorptionsmaximum des Hauptpeaks sollte zwischen 300–1500 mAU liegen. Falls erforderlich erfolgte eine Verdünnung mit DMSO.

Elution: Injektionsvolumen: 2–20 µL, Flussrate: 1.000 mL/min; isokratische Elution: Gesamtlaufzeit: 15 min; angestrebte Gesamtretentionszeit ( $t_{M+S}$ ):  $t_{M+S} = 3-8$  min;  $t_M$  = Totzeit bezogen auf DMSO; Elutionsmittel bei isokratischer Elution: Gemische aus ACN und Wasser (bidest.) im jeweils angegebenen Verhältnis. In einigen Fällen wurde anstelle von Wasser ein Triethylammoniumsulfat-Puffer (Puffer<sub>pH 2.7</sub>) verwendet. (Pufferherstellung: Lösung von 20 mL Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid in Wasser (bidest.) ad 1.0 L und pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH 2.7); Gradientenelution (HPLC-2): Gesamtlaufzeit: 20 min; Gemische aus ACN und

Wasser (bidest.); Verlauf bei Gradientenelution mit ACN/Wasser: 0–2 min: 10% ACN, 2–12 min: 10% → 90% ACN, linear, 12–20 min 90% ACN; Gradientenelution (HPLC-3): Gesamtlaufzeit: 20 min; Gemische aus ACN und Wasser (bidest.); Verlauf bei Gradientenelution mit ACN/Wasser: 0–2 min: 10% ACN, 2–12 min: 10% → 90% ACN, linear, 12–20 min 90% ACN.

Detektion: sofern nicht anders angegeben: bei isokratischer Elution: DAD bei 254 nm und 280 nm; bei Gradientenelution (HPLC-2): UV bei 254 nm; bei Gradientenelution (HPLC-3): DAD bei 254 nm.

Auswertung: Bestimmung der Gesamtretentionszeit ( $t_{M+S}$ ) und der Totzeit ( $t_M$ ) bezogen auf DMSO; Integration der Peakflächen und Auswertung nach 100%-Methode; HPLC-1 und HPLC-2: Integrationsausschluss 0–1.6 min, Threshold 1000; Absorptionsmaxima ( $\lambda_{max}$ ) entnommen aus den UV-Spektren des DAD von HPLC-1, verwendete Software: HPLC-1 EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3, HPLC-2: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.3.2 SP. HPLC-3: Integrationsausschluss 0–1.6 min, Sensitivity 100, Noise 10, Absorptionsmaxima ( $\lambda_{max}$ ) entnommen aus den UV-Spektren des DAD; verwendete Software: Chromaster System Manager, Version 1.1.

### **Dünnschichtchromatographie**

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV<sub>254</sub>, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion bei 254 nm und 366 nm; als Fließmittel wurden meist Gemische aus Petrolether und Ethylacetat oder Gemische aus Methanol und Dichlormethan verwendet.

### **Elementaranalytik**

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte sind in Prozent angegeben. Bei den gefundenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwei Messungen (Abweichung der Einzelmesswerte vom Mittelwert 1–5%).

## Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Nicolet, Madison, WI, USA; die Substanzen wurden als KBr-Presslinge vermessen oder flüssige Substanzen auf NaCl-Fenster.

## Inkubationsschüttler

IKA® KS 3000 ic control; Externer Kühler: KV 600 digital – 230 V, IKA®-Werke, Staufen, Deutschland.

## Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 101 MHz),  
 Bruker Avance III-400 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 101 MHz),  
 Bruker Avance II-600 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 151 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; die Messungen der NMR-Spektren wurden in den NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig durchgeführt. Chemische Verschiebungen werden als  $\delta$ -Werte in ppm angegeben. Als Referenz dient der interne Standard Tetramethylsilan.

Lösungsmittel: DMSO- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ .

$^1\text{H}$ -NMR: Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta$ -TMS-Skala (sofern nicht anders angegeben); Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta$ -TMS-Skala (sofern nicht anders angegeben); Aufnahme der Spektren mit  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung sowie routinemäßig mit  $^{13}\text{C}$ -135DEPT-Experimenten. Die Zuordnung der Signale erfolgt auf Basis der  $^{13}\text{C}$ -135DEPT-Experimente.

Zuordnung der Signale teilweise mit Hilfe von 2D-Experimenten ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC).

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, sept = Septett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet, tt = Triplet vom Triplet.

## Massenspektrometrie

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig auf einem Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen. Ionisationsenergie: 70 eV; Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) erfolgten mit Bezug auf den internen Massenstandard Perfluorkerosin, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations  $[M]^+$  oder des Signals  $[M-H]^+$ ; angegeben werden berechnete (ber.) und gefundene (gef.) Werte.

Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI): expression<sup>L</sup> CMS, kombinierte ASAP (*atmospheric solids analysis probe*) und APCI Ionenquelle, Fa. Advion Ltd., Harlow, Großbritannien. Source Gas Temperature 350 °C, APCI Corona Discharge 5  $\mu$ A, Parameter für **73**: Polarity: Positive, Capillary Temperature: 250 °C, Capillary Voltage: 180 V, Source Voltage Offset: 25 V, Source Voltage Span: 20 V; Parameter für **74a**: Polarity: Positive, Capillary Temperature: 250 °C, Capillary Voltage: 150 V, Source Voltage Offset: 15 V, Source Voltage Span: 20 V; Software Advion Mass Express, Version 3.1.21.1.

## Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen<sup>TM</sup> Synthese System, Typ Discover; Chem Driver<sup>TM</sup> Application Software Program und Typ Discover SP; Synergy Software; Reaktionsgefäße: 10 mL oder 40 mL mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

## pH-Meter

632 pH-Meter, Glaselektrode, Fa. Metrohm GmbH und Co. KG, Filderstadt, Deutschland.



## Röntgenkristallstruktur-Analyse

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K $\alpha$ -Strahlung vermessen.

Strukturauflösung: Direkte Methoden; Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten siehe Abschnitt 9.2.2.

Die Röntgenkristallstruktur-Analyse der Verbindungen **43p**, **65e** und **74a** wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter G. Jones (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

## Schmelzpunktbestimmung (Schmp.)

Die Bestimmung erfolgte in offenen Glaskapillaren mit einem Electrothermal IA 9200, Bibby Scientific, Stone, Großbritannien. Falls eine Zersetzung beobachtet wurde, wurde dies mit der Abkürzung Zersetz. gekennzeichnet.

## Waagen

Analysenwaage Sartorius CPA 224S, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.

Analysenwaage Sartorius Entris 224I-1s, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.

Mikrowaage Sartorius MC5, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.

## Vorbehandlung von Lösungsmitteln

Falls nicht anders angegeben, wurden Lösungsmittel ohne weitere Vorbehandlung verwendet. Die Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte in Anlehnung an Vorschriften aus der Literatur.

Dichlormethan: Dichlormethan wird über Natriumsulfat vorgetrocknet, filtriert und dann mit Calciumhydrid versetzt (0.28 g bei 0.4 L Dichlormethan). Es wird 5 h unter Rückfluss erhitzt (bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist), dann wird

Dichlormethan abdestilliert und über Molsieb (4 Å) gelagert. Modifiziert nach AMAREGO *et al.*<sup>142</sup>

1,4-Dioxan: 1,4-Dioxan (200 mL) wird mit Calciumchlorid (10 g) bei RT und unter gelegentlichem Schütteln 1 h stehen gelassen. Nachdem dekantiert wurde, wird mit Natrium (3 g) und Benzophenon (0.6 g) versetzt und zum Rückfluss erhitzt bis eine intensive Blaufärbung auftritt. Danach wird 1,4-Dioxan durch Destillation abgetrennt und auf Molsieb (4 Å) gelagert. Modifiziert nach AMAREGO *et al.*<sup>143</sup>

Pyridin: Pyridin wurde mindestens 24 h über Molsieb (4 Å) gelagert.

Tetrahydrofuran: THF (1 L) wird über basisches Aluminiumoxid (ca. 30 g) eluiert, um vorhandene Peroxide zu entfernen. Anschließend wird das Lösemittel 24 h über KOH-Plätzchen (20 g) gelagert. Nach dem Dekantieren wird mit Calciumhydrid (2-3 g) versetzt und zum Rückfluss erhitzt (3–4 h). THF wird durch anschließende Destillation abgetrennt und auf KOH-Plätzchen oder Molsieb (4 Å) gelagert. *Vorsicht!* Peroxidbildung möglich. Modifiziert nach AMAREGO *et al.*<sup>144</sup>

Toluen: Toluen wird über Natriumsulfat vorgetrocknet, filtriert und dann nach und nach mit Phosphorpentoxid versetzt bis kein Sprudeln mehr auftritt. Nach 20 h Lagerung mit Phosphorpentoxid wird Toluen abdestilliert und mit Calciumhydrid versetzt (1 g bei 1 L Toluen). Es wird 6 h zum Rückfluss erhitzt (bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist), dann Toluen abdestilliert und über Molsieb (4 Å) gelagert. Modifiziert nach AMAREGO *et al.*<sup>145</sup>

### **Ausgangsstoffe**

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden von folgenden Unternehmen bezogen: Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland), Alfa-Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Acros (Geel, Belgien), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Enamine (Monmouth Jct., NJ, USA), Fluorochem (Hadfield, UK).

## 9.2 Synthesen und analytische Daten

### 9.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Carbonsäureanilide **43** aus Carbonsäurechloriden (AAV1)

Das Anilinderivat (1.0 Äquivalente) wird zusammen mit Triethylamin (1.1–2.7 Äquivalente) in getrocknetem Toluol (5 mL pro 1.5 mmol) vorgelegt und der Reaktionskolben mit Eiswasser gekühlt. Zur gekühlten Lösung wird das Säurechlorid (1.1 Äquivalente) langsam und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) zugetropft. Die Lösung wird langsam bis auf Raumtemperatur erwärmt und dann 2–24 h weiter bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird via Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beenden der Reaktion wird das Reaktionsgemisch nacheinander mit verdünnter Salzsäurelösung (Salzsäure (37%)/Wasser 1:4, 3 x 10 mL), mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL), mit gesättigter Kochsalzlösung (10 mL) und anschließend mit Wasser (10 mL) gewaschen. Dann wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird umkristallisiert oder durch Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der *tert*-Butyl-*N*-{2-[(2-phenoxyphenyl)-amino]-2-oxoethyl}carbamate **43i** und **43s** (AAV2)

Zu einer Lösung von Boc-geschütztem Glycin (1.50–2.00 mmol) und PyBOP (1.60–2.09 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) wird DIPEA (3.44–4.59 mmol) zugegeben. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und 30 min unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) gerührt. Zur kalten Lösung wird 2-Phenoxyanilin (1.50 mmol), gelöst in wasserfreiem Dichlormethan (3–5 mL) und im Falle eines Hydrochlorids unter Zusatz von DIPEA (400 µL, 2.30 mmol), hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat (10 mL) versetzt und mit gesättigter

Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x 5 mL), mit gesättigter Kochsalzlösung (2 x 5 mL) und mit verdünnter Salzsäurelösung (Salzsäure (37%)/Wasser 1:3, 3 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird durch Umkristallisation oder säulenchromatographisch gereinigt und das isolierte Produkt bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Diarylthioethern **44** und 3-substituierten 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen **73** durch konventionelles Erhitzen (AAV3)

Es wird eine Lösung eines chloresubstituierten Heteroaromaten (1.0 Äquivalente), einer Thionverbindung (1.1–1.2 Äquivalente) und einer Base (1.1–1.2 Äquivalente) im angegebenen Lösungsmittel (2–5 mL) hergestellt. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss für 24–48 h gerührt. Wenn das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird es auf Eis (10 g) geleert, das Reaktionsgefäß mit Wasser (5 mL) ausgespült und dem Eis hinzugegeben. Der nach kurzer Zeit präzipitierte Feststoff wird durch Umkristallisation und/oder Säulenchromatographie auf Kieselgel gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Diarylthioethern **44** und **72** in der Synthesemikrowelle (AAV4)

In einem Mikrowellengefäß wird eine Lösung eines chloresubstituierten Heteroaromaten (1.0 Äquivalente), einer Thionverbindung (1.1–1.2 Äquivalente) und einer Base (1.1–1.2 Äquivalente) im angegebenen Lösungsmittel (2–3 mL) hergestellt. Nach dem Verschließen des Reaktionsgefäßes mit einer Kunststoffkappe mit Tefloneinlage wird das Reaktionsgemisch unter Mikrowelleneinstrahlung (Methode: 100–200 W, 5 min *ramp time*, Reaktionszeit 20–150 min, Maximaldruck 145 psi) bei 90–140 °C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis (10 g) geleert, das Reaktionsgefäß mit Wasser (5 mL) ausgespült und dem Eis hinzugegeben. Der nach kurzer Zeit präzipitierte Feststoff wird durch Umkristallisation und/oder Säulenchromatographie auf Kieselgel gereinigt.

Allgemein Arbeitsvorschriften zur Abspaltung einer Boc-Schutzgruppe:Saure Hydrolyse mit Trifluoressigsäure zur Synthese von **43j** und **43t** (AAV5)

Es wird eine Lösung der entsprechenden *N*-Boc-geschützten Verbindung (1.0 Äquivalente) in getrocknetem Dichlormethan (10–15 mL) vorgelegt. Der Reaktionskolben wird mit Stickstoff gespült und mit Eiswasser gekühlt. Anschließend wird Trifluoressigsäure (9.7–9.9 Äquivalente) zugetropft, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 24 h unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in Propan-2-ol (ca. 5 mL) aufgenommen und mit einem 1:1-Gemisch aus Salzsäure (37%) und Propan-2-ol (4–5 Tropfen) versetzt. Der daraufhin präzipitierte Feststoff wird abfiltriert, mit Diethylether (20–30 mL) versetzt und 30 min zum Rückfluss erhitzt. Danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt und zur Vervollständigung der Kristallisation über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Feststoff wird filtriert und bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

Saure Hydrolyse mit Trifluoressigsäure zur Synthese von **44r** und **44s** (AAV6)

Eine Lösung der entsprechenden *N*-Boc-geschützten Verbindung (1.0 Äquivalente) in getrocknetem Dichlormethan (10–20 mL) wird unter Schutzatmosphäre (Argon oder Stickstoff) mit einem Überschuss Trifluoressigsäure (10–32 Äquivalente) versetzt und bei Raumtemperatur für 18–25 h gerührt. Danach wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Propan-2-ol (0.5 mL) aufgenommen und mit Salzsäure (37%) (2–5 Tropfen) versetzt, sodass ein Feststoff ausgefällt wird. Es wird Diethylether (15–20 mL) zugegeben und 30–60 min zum Rückfluss erhitzt. Wenn das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird filtriert und der isolierte Feststoff zur weiteren Reinigung umkristallisiert.

Saure Hydrolyse mit Chlorwasserstoffgas zur Synthese von **65c** und **65d** (AAV7) in Anlehnung an eine Vorschrift von JANSEN *et al.*<sup>114</sup>

Das entsprechende *N*-Boc-geschützte 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-thion (2.05–2.24 mmol) wird in einem Diethylether-Methanol-Gemisch (10.5–11.5 mL) gelöst und über einem

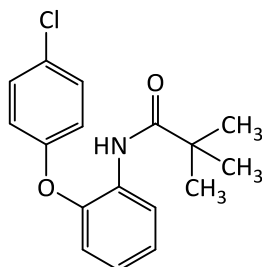
Eis-Kochsalzbad gekühlt. Unter Rühren wird für 30 min Chlorwasserstoffgas in die Lösung eingeleitet. Der präzipitierende Feststoff wird im Anschluss abfiltriert und mit Diethylether (10 mL) gewaschen. Daraufhin wird der Feststoff in Aceton (15 mL) aufgenommen und 30 min zum Rückfluss erhitzt. Noch in der Hitze wird filtriert und so das Hydrochlorid isoliert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-thionen **65** (AAV8) in Anlehnung an eine Vorschrift von JANSEN *et al.*<sup>114</sup>

Zu der Lösung eines entsprechenden Carbonsäurehydrazids (1.0 Äquivalente) und Kaliumhydroxid (1.0 Äquivalente) in Ethanol (ca. 5 mL je 2.8 mmol Hydrazid) wird Kohlenstoffdisulfid (3.3 Äquivalente) zugetropft und zunächst 20–30 min bei RT gerührt. Dann wird für 6.5–20 h zum Rückfluss erhitzt, wobei der Reaktionsfortschritt via Dünnschichtchromatographie verfolgt wird. Danach wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit Propan-2-ol (1 mL) angelöst, mit Eiswasser (20 mL) versetzt und mit Salzsäure (37%) auf pH 1 eingestellt. Der Feststoff wird abfiltriert und zur weiteren Reinigung gegebenenfalls umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Imidazopyridin-2(3H)-thione **67** (AAV9) in Anlehnung an eine Vorschrift von Chang *et al.*<sup>120</sup>

Zu einer Lösung eines entsprechenden Diaminopyridins (1 Äquivalent) und Kaliumhydroxid (1 Äquivalent) in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (10:1, je 1.0 mol ca. 11 mL) wird bei Raumtemperatur Kohlenstoffdisulfid (3 Äquivalente) zugetropft, dann für 30–60 min bei einer Heizbadtemperatur von 80 °C gerührt und anschließend für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Wenn das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand ist ausreichend rein, um für nachfolgende Synthesen verwendet zu werden.

9.2.2 Synthesevorschriften und analytische Daten der synthetisierten SubstanzenN-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]-2,2-dimethylpropanamid (**43a**)

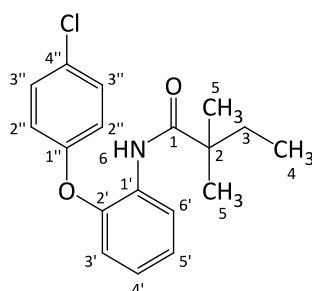
Methode A: Zu einer Lösung von 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol) und Triethylamin (312  $\mu$ L, 2.25 mmol) in trockenem THF (5 mL) wurde Pivalinsäurechlorid (276  $\mu$ L, 2.25 mmol) langsam zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 24 h bei Raumtemperatur und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) gerührt. Danach wurde mit Wasser (5 mL) versetzt, wobei sich ein braunes Öl absetzte, welches von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Das Öl wurde mit Dichlormethan (15 mL) verdünnt und mit verdünnter Salzsäurelösung (Salzsäure (37%)/Wasser 1:1, 5 mL) gewaschen. Danach wurde die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 10 mL) und mit gesättigter Kochsalzlösung (10 mL) gewaschen. Daraufhin wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde als hellbrauner Feststoff, der unter Vakuum bei 60 °C getrocknet wurde, in einer Ausbeute von 364 mg (1.20 mmol, 80%) erhalten.

Methode B: Nach AAV1 aus 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.5 mmol), Pivalinsäurechlorid (203  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL). Nach einer Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurden 277 mg (0.912 mmol, 61%) des Produkts als hellbraune Kristalle erhalten.

Schmp.: 99–100 °C ; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3336 (br, N-H), 1663 (s, C=O);  $^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 1.05 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 6.80–7.01 (m, 2H, ArH), 6.99–7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.15–7.32 (m, 2H, Ar-H), 7.27–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.56–7.78 (m, 1H, Ar-H), 8.72 (s, 1H, N-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 26.95 (CH<sub>3</sub>, 3C), 118.40 (2C), 120.46, 124.63, 126.13, 126.62, 129.49 (2C) (CH), 38.12, 126.38, 130.28, 147.84, 155.91 (C),

176.13 (CONH);  $C_{17}H_{18}ClNO_2$  (303.78): ber. C 67.21, H 5.97, N 4.61, gef. C 67.13, H 6.00, N 4.51; MS (EI):  $m/z$  (%) = 303.1  $[M]^+$  (24), 219.0  $[M^+-84]$  (42), 176.1  $[M^+-127]$  (100); HPLC (isokratisch): 99.7% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 7.42 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min,  $\lambda_{max}$  [nm] = 230, 275; HPLC (Gradient): 99.4%,  $t_{M+S}$  = 13.62 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]-2,2-dimethylbutanamid (**43b**)



\*Die Nummerierung der Atome dient der Zuordnung der NMR-Signale und entspricht nicht den Regularien nach IUPAC

Methode A: Zu einer Lösung des 2-(4-Chlorphenoxy)anilins (505 mg, 2.30 mmol) in getrocknetem Pyridin (5 mL) wurde 2,2-Dimethylbuttersäurechlorid (481  $\mu$ L, 3.50 mmol) langsam zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 4.25 h bei Raumtemperatur und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (5 mL) verdünnt, mit Salzsäure (37%) auf pH 3–4 eingestellt und mit Ethylacetat (4 x 7 mL) extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde unter Vakuum bei 60 °C getrocknet. Das Produkt wurde als hellbrauner Feststoff in einer Ausbeute von 0.62 g (1.94 mmol, 86%) erhalten.

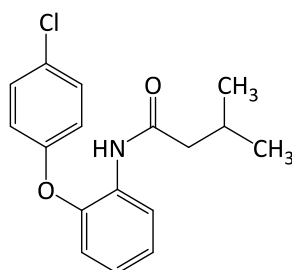
Methode B: Nach AAV1 aus 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), 2,2-Dimethylbuttersäurechlorid (227  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL). Es folgte eine Umkristallisation aus einem Methanol-



Wasser-Gemisch (33:10). Das Produkt wurde als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 332 mg (1.05 mmol, 70%) erhalten.

Schmp.: 69–70 °C ; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3316 (br, N-H), 1657 (s, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 0.67 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-4), 1.01 (s, 6H, H-5), 1.47 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3), 6.87–6.96 (m, 2H, H-2''), 7.03–7.13 (m, 1H, H-3'), 7.17–7.27 (m, 2H, H-4', H-5'), 7.34 – 7.43 (m, 2H, H-3''), 7.59–7.68 (m, 1H, H-6'), 8.70 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 8.82 (C-4), 24.54 (C-5, 2C) (CH<sub>3</sub>), 32.82 (C-3) (CH<sub>2</sub>) 118.49 (C-2'', 2C), 120.46 (C-3'), 124.63 (C-5'), 126.16 (C-4'), 126.74 (C-6'), 129.55 (C-3'', 2C) (CH), 42.42 (C-2), 126.43 (C-4''), 130.29 (C-1'), 147.98 (C-2'), 155.99 (C-1''), 175.48 (C-1) (C); C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub> (317.81): ber. C 68.03, H 6.34, N 4.41, gef. C 68.09, H 6.22, N 4.28; MS (EI): *m/z* (%) = 317.1 [M]<sup>+</sup> (33), 219.0 [M<sup>+</sup>-98] (55), 190.1 [M<sup>+</sup>-127] (100); HPLC (isokratisch): 98.7% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 9.82 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 232, 275; HPLC (Gradient): 97.3%, *t*<sub>M+S</sub> = 14.17 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]-3-methylbutanamid (**43c**)

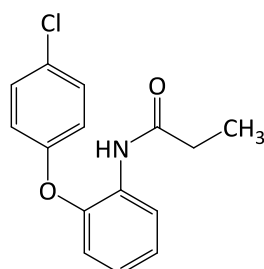


Nach AAV1 aus 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), Isovaleriansäurechlorid (201  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL). Im Anschluss wurde eine Säulenchromatographie (DCM/MeOH: 200/1) durchgeführt und das Produkt als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 418 mg (1.38 mmol, 92%) erhalten.

Schmp.: 69–70 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3291 (m, N-H), 1655 (s, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.81 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.92 (sept, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.79–7.08 (m, 3H, ArH), 7.08–7.25 (m, 2H, ArH), 7.28–7.51

(m, 2H, ArH), 7.88 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H, ArH), 9.38 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.10 ( $\text{CH}_3$ , 2C), 44.93 ( $\text{CH}_2$ ), 25.60, 119.28 (2C), 119.83, 124.34, 124.87, 125.25, 129.56 (2C) (CH), 126.67, 130.18, 147.04, 155.98 (C), 170.89 (CONH);  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$  (303.78): ber. C 67.21, H 5.97, N 4.61, gef. C 66.95, H 6.02, N 4.39; MS (EI):  $m/z$  (%) = 303.1  $[\text{M}]^+$  (16), 219.0  $[\text{M}^+ - 84]$  (100), 176.1  $[\text{M}^+ - 127]$  (13); HPLC (isokratisch): 98.1% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}} = 6.03$  min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.06$  min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 249; HPLC (Gradient): 95.6% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}} = 13.23$  min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.28$  min.

#### *N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]propanamid (**43d**)



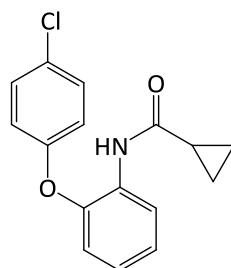
Methode A: Zu einer Lösung von 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (390 mg, 1.78 mmol) in getrocknetem Pyridin (5 mL) wurde langsam Propionylchlorid (232  $\mu\text{L}$ , 2.66 mmol) bei Raumtemperatur zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 6.5 h bei Raumtemperatur und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (10 mL) verdünnt, mit Salzsäure (37%) auf pH 2–3 eingestellt und das sich daraufhin abscheidende Öl abgetrennt. Das Öl wurde mit Ethylacetat (10 mL) verdünnt und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x 10 mL), mit gesättigter Kochsalzlösung (10 mL) und verdünnter Salzsäurelösung (Salzsäure (37%)/Wasser 1:1, 3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das zurückbleibende Öl wurde anschließend säulenchromatographisch (DCM/MeOH: 50:1) gereinigt und so das Produkt in einer Ausbeute von 182 mg (0.660 mmol, 37%) als farbloser Feststoff erhalten.

Methode B: Nach AAV1 wurden 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), Propionylchlorid (143  $\mu\text{L}$ , 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu\text{L}$ , 1.65 mmol) in

trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Die Substanz wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EA: 4:1) gereinigt und das Produkt in einer Ausbeute von 265 mg (0.961 mmol, 64%) in Form farbloser Kristalle erhalten.

Schmp.: 99–100 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3330 (br, N-H), 1675 (s, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 0.98 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.29 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.93–7.02 (m, 3H, ArH), 7.08–7.22 (m, 2H, ArH), 7.37–7.46 (m, 2H, ArH), 7.91–7.98 (m, 1H, ArH), 9.39 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 9.65 (CH<sub>3</sub>), 29.03 (CH<sub>2</sub>), 119.53 (2C), 124.24, 124.43, 125.02, 129.59 (2C) (CH), 126.78, 130.19, 146.93, 155.85 (C), 172.31 (CONH), ein Signal fehlt im <sup>13</sup>C-NMR; C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>2</sub> (275.73): ber. C 65.34, H 5.12, N 5.08, gef. C 65.33, N 4.98, H 5.02; MS (EI): *m/z* (%) = 275.1 [M]<sup>+</sup> (22), 219.0 [M<sup>+</sup>-56] (100), 148.1 [M<sup>+</sup>-127] (24); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.95 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 248, 274; HPLC (Gradient): 96.0%, *t*<sub>M+S</sub> = 12.23 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

***N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]cyclopropancarboxamid (43e)**

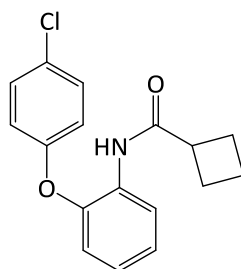


Nach AAV1 wurden 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), Cyclopropancarbonsäurechlorid (150  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Anschließend wurde aus Ethanol (70%) umkristallisiert. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 387 mg (1.34 mmol, 90%) in Form beiger Nadeln erhalten.

Schmp.: 100–102 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3371, 3332 (m, N-H), 1663 (s, C=O), <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.67–0.77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.95 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH), 6.94 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.96–7.03 (m, 2H, ArH), 7.06–7.26 (m, 2H, ArH), 7.23 – 7.63 (m, 2H, ArH), 7.96 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.71 (s, 1H,

NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 7.16 ( $\text{CH}_2$ , 2C), 13.86, 119.14, 119.70 (2C), 124.01, 124.73, 129.55 (2C) (CH), 126.82, 130.09, 146.66, 155.71 (C), 171.99 (CONH);  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$  (287.74): ber. C 66.79, H 4.90, N 4.87, gef. C 66.96, H 4.92, N 4.77; MS (EI):  $m/z$  (%) = 287.1  $[\text{M}]^+$  (21), 219.0  $[\text{M}^+-68]$  (100), 160.1  $[\text{M}^+-127]$  (33); HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.40 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 241; HPLC (Gradient): 97.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.57 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]cyclobutancarboxamid (**43f**)



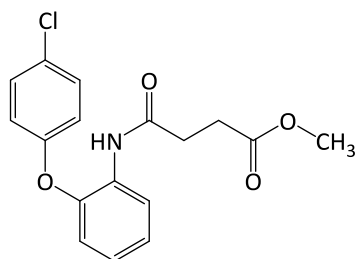
Methode A: Zu einer Lösung aus 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol) und Triethylamin (312  $\mu\text{L}$ , 2.25 mmol) in trockenem THF (5 mL) wurde Cyclobutancarbonsäurechlorid (267  $\mu\text{L}$ , 2.25 mmol) langsam zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr mit Calciumchlorid) insgesamt 24 h bei Raumtemperatur und 7 h unter Rückfluss gerührt. Danach wurde mit Wasser (5 mL) und mit Ethylacetat (5 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 10 mL), Kochsalzlösung (10 mL) sowie mit verdünnter Salzsäurelösung (Salzsäure (37%)/ Wasser 1:1, 3 x 10 mL) extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das zurückbleibende rotbraune Öl wurde säulenchromatographisch (DCM/*i*-PrOH: 200:1) gereinigt und das Produkt in einer Ausbeute von 214 mg (0.709 mmol, 47%) als farbloser Feststoff erhalten.

Methode B: Nach AAV1 wurden 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), Cyclobutancarbonsäurechlorid (190  $\mu\text{L}$ , 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu\text{L}$ , 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Die Substanz wurde mittels

Säulenchromatographie gereinigt (Toluen/PE: 10:1 → 20:1) und das Produkt in einer Ausbeute von 246 mg (0.815 mmol, 54%) als hellbrauner Feststoff erhalten.

Schmp.: 88–89 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3433 (br, N-H), 1657 (ss, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.66–2.14 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 3.19–3.33 (m, 1H, CH), 6.90–7.03 (m, 3H, ArH), 7.12–7.20 (m, 2H, ArH), 7.36–7.45 (m, 2H, ArH), 7.91 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.22 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 17.65, 24.47 (2C) (CH<sub>2</sub>), 38.88, 119.28 (2C), 119.78, 124.36, 124.74, 125.18, 129.55 (2C) (CH), 126.68, 130.18, 147.00, 155.87 (C), 173.09 (CONH); C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>2</sub> (301.77): ber. C 67.66, H 5.34, N 4.64, gef. C 67.81, H 5.43, N 4.55; MS (EI): *m/z* (%) = 301.1 [M]<sup>+</sup> (19), 219.0 [M<sup>+</sup>-82] (100), 174.1 [M<sup>+</sup>-127] (25); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 5.86 min; *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 229; HPLC (Gradient): 98.4%, *t*<sub>M+S</sub> = 13.15 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

#### 4-{[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]amino}-4-oxobutansäuremethylester (43g)

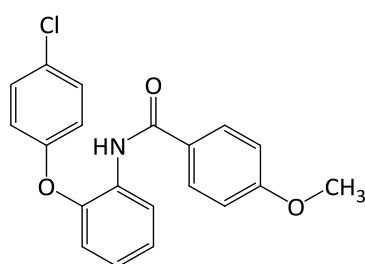


Nach AAV1 wurden 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), Bernsteinsäuremethylesterchlorid (202  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Anschließend wurde aus Methanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 278 mg (0.833 mmol, 56%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 109–110 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3341 (m, N-H), 1721 (s, C=O, Ester) 1687 (s, C=O, Amid); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 2.35–2.97 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.83 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH), 6.93–7.05 (m, 3H, ArH), 7.12 (td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.28–7.38 (m, 2H, ArH), 7.91 (s, 1H, NH), 8.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 51.93 (CH<sub>3</sub>), 29.15, 32.27 (CH<sub>2</sub>), 117.77, 119.84

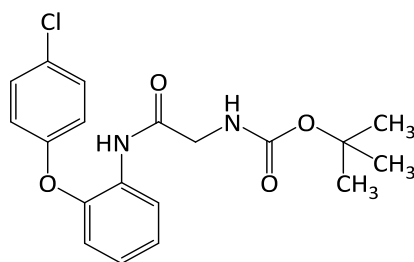
(2C), 121.14, 124.10, 124.44, 129.95 (2C) (CH), 128.98, 129.78, 145.22, 155.13 (C), 169.69, 173.23 (C=O);  $C_{17}H_{16}ClNO_4$  (333.77): ber. C 61.18, H 4.83, N 4.20, gef. C 61.15, H 4.83, N 4.21; MS (EI):  $m/z$  (%) = 333.1  $[M]^+$  (12), 219.0  $[M^+-114]$  (77), 174.1  $[M^+-159]$  (100); HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 3.44 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{max}$  [nm] = 228; HPLC (Gradient): 98.5% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 11.99 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

***N*-[2-(4-Chlorphenoxy)phenyl]-4-methoxybenzamid (43h)**



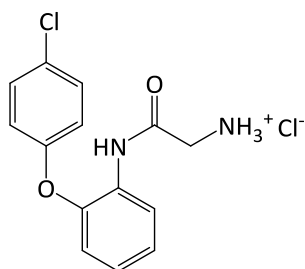
Nach AAV1 wurden 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol), 4-Methoxybenzoylchlorid (281 mg, 1.65 mmol) und Triethylamin (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) in trockenem Toluol (7 mL) umgesetzt. Anschließend wurde aus Methanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 346 mg (0.978 mmol, 65 %) als farblose Nadeln erhalten.

Schmp.: 101–102 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3420 (m, N-H), 1660 (s, C=O);  $^1H$ -NMR: (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.89–7.13 (m, 5H, ArH), 7.17–7.30 (m, 2H, ArH), 7.30–7.48 (m, 2H, ArH), 7.65–7.76 (m, 1H, ArH), 7.75–7.99 (m, 2H, ArH), 9.69 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR: (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 55.29 (CH<sub>3</sub>), 113.44 (2C), 119.36 (2C), 119.69, 124.15, 126.32, 126.83, 129.38 (2C), 129.48 (2C) (CH), 126.25, 126.64, 129.79, 149.02, 155.71, 161.80 (C), 164.69 (CONH);  $C_{20}H_{16}ClNO_3$  (353.80): ber. C 67.90, H 4.56, N 3.96, gef. C 67.78, H 4.43, N 3.95; MS (EI):  $m/z$  (%) = 353.1  $[M]^+$  (8), 226.1  $[M^+-127]$  (24), 135.0  $[M^+-218]$  (100); HPLC (isokratisch): 99.7% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 6.37 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{max}$  [nm] = 266; HPLC (Gradient): 99.0% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 13.37 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

*tert*-Butyl-*N*-{2-[(2-(4-Chlorphenoxy)phenyl)amino]-2-oxoethyl}carbamat (**43i**)

Nach AAV2 wurden Boc-geschütztes Glycin (263 mg, 1.50 mmol), PyBOP (833 mg, 1.60 mmol) und 2-(4-Chlorphenoxy)anilin (330 mg, 1.50 mmol) zusammen mit DIPEA (600  $\mu$ L, 3.44 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) umgesetzt. Es wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH: 200:1) gereinigt und das isolierte Produkt bei 60 °C unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 358 mg (0.952 mmol, 63%) als leicht gelber Feststoff erhalten.

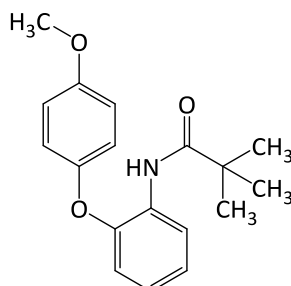
Schmp.: 50–51 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3409 (m, N-H), 3342 (s, N-H), 1691 (br, s, C=O);  $^1\text{H}$ -NMR: (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.34 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.71 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.87–7.06 (m, 3H, ArH), 7.05–7.30 (m, 3H, ArH), 7.35–7.53 (m, 2H, ArH), 8.12 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, NH), 9.33 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 28.00 (3C,  $\text{CH}_3$ ), 43.92 ( $\text{CH}_2$ ), 118.82, 119.90 (2C), 122.35, 124.15, 124.63, 129.70 (2C) (CH), 78.17, 127.17, 129.64, 146.09, 155.47, 155.86, 168.51 (C); MS (EI):  $m/z$  (%) = 376.1 [ $\text{M}$ ] $^{+}$  (11), 219.1 [ $\text{M}^{+}$ –157] (100); HRMS (EI): ber. für  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_4$  376.11844, gef. 376.11803; HPLC (isokratisch): 96.3% bei 254 nm, 96.3% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.84 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 230; HPLC (Gradient): 95.8% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.80 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.28 min.

2-{N-[2-(4-chlorphenoxy)phenyl]amino}-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**43j**)

Nach AAV5 wurde eine Lösung von *tert*-Butyl-*N*-{2-[(2-(4-Chlorphenoxy)phenyl)amino]-2-oxoethyl}carbamate (**43i**) (490 mg, 1.31 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) mit Trifluoressigsäure (1.0 mL, 13 mmol) umgesetzt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 220 mg (0.702 mmol, 54%) erhalten.

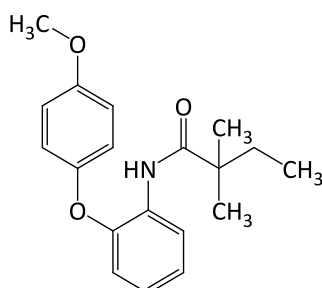
Schmp.: 256–257 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3434 (m, br, N-H), 3124 (m, N-H), 1673 (s, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.95 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.01–7.05 (m, 2H, ArH), 7.13–7.21 (m, 2H, ArH), 7.42–7.48 (m, 2H, ArH), 8.03 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 8.14 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 10.12 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 40.91 (CH<sub>2</sub>), 118.99, 120.12 (2C), 123.27, 124.12, 125.52, 129.72 (2C) (CH), 127.22, 128.90, 146.92, 155.45 (C.), 165.48 (CONH); C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·HCl (313.18): ber. C 53.69, H 4.51, N 8.95, gef. C 53.89, H 4.51, N 8.57; MS (EI): *m/z* (%) = 276.0 [*M*<sub>freie Base</sub>]<sup>+</sup> (36), 219.0 [*M*<sup>+</sup>-54] (100); HPLC (isokratisch): 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.41 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 30:70),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 231.



*N*-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]-2,2-dimethylpropanamid (**43k**)

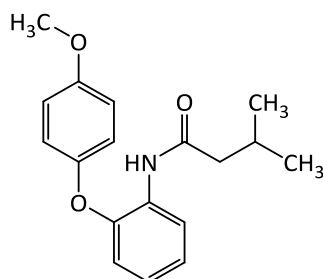
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Pivaloylchlorid (203  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.0 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Anschließend wurde aus Ethanol (70%) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 401 mg (1.34 mmol, 89%) als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 70–71 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3317 (m, N-H), 1661 (s, C=O);  $^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.11 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.85–6.90 (m, 1H, ArH), 6.92 (s, 4H, ArH), 7.06–7.16 (m, 2H, ArH), 7.69–7.78 (m, 1H, ArH), 8.62 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 27.06 (3C), 55.41 (CH<sub>3</sub>), 114.86 (2C), 118.35, 119.09 (2C), 123.25, 125.06, 125.40 (CH), 38.90, 129.48, 148.96, 149.97, 155.27 (C), 176.10 (CONH); C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (299.37): ber. C 72.22, H 7.07, N 4.68, gef. C 72.21, H 7.25, N 4.73; MS(EI):  $m/z$  (%) = 299.1 [M]<sup>+</sup> (48), 215.1 [M<sup>+</sup>-84] (23), 200.1 [M<sup>+</sup>-99] (41), 176.1 [M<sup>+</sup>-123] (100); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.21 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 248; HPLC (Gradient): 99.3% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.88 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]-2,2-dimethylbutanamid (**43l**)

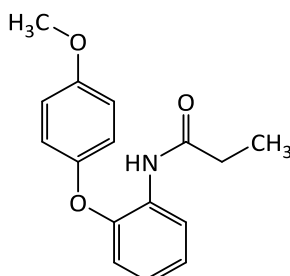
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), 2,2-Dimethylbuttersäurechlorid (230  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Anschließend wurde aus Ethanol (70%) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 415 mg (1.32 mmol, 88%) als hellgelber Feststoff isoliert.

Schmp.: 71–72 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3433 (m, N-H), 1674 (s, C=O);  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.72 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.07 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.51 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.72 (s, 1H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.83–6.92 (m, 1H, ArH), 6.92 (s, 4H, ArH), 7.05–7.18 (m, 2H, ArH), 7.66–7.74 (m, 1H, ArH), 8.60 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 8.90, 32.96 (2C), 55.42 ( $\text{CH}_3$ ), 24.61 ( $\text{CH}_2$ ), 114.90 (2C), 118.31, 119.17 (2C), 123.21, 125.34, 125.50 (CH), 42.56, 129.43, 149.21, 150.00, 155.28 (C), 175.42 (CONH);  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$  (313.40): ber. C 72.84, H 7.40, N 4.47, gef. C 72.72, H 7.45, N 4.52; MS (EI):  $m/z$  (%) = 313.1 [ $\text{M}^+$ ] (51), 215.1 [ $\text{M}^+ - 98$ ] (40), 200.1 [ $\text{M}^+ - 113$ ] (45), 190.1 [ $\text{M}^+ - 123$ ] (100); HPLC (isokratisch): 98.0% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 6.69 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 228; HPLC (Gradient): 98.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.43 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

**N-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]-3-methylbutanamid (43m)**

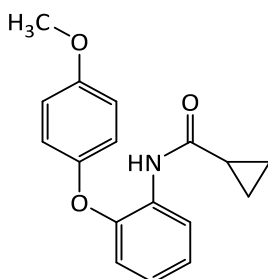
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Isovaleriansäurechlorid (201  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (5 mL) umgesetzt. Anschließend wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EA: 4:1) gereinigt und das Produkt in einer Ausbeute von 303 mg (1.01 mmol, 67%) als farbloses Öl erhalten.

IR (NaCl):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3426 (m, N-H), 3317 (m, br, N-H), 1679 (s, C=O);  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.99 (sept,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, CH), 2.21 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.72–6.83 (m, 1H, ArH), 6.89–7.01 (m, 4H, ArH), 7.01–7.10 (m, 2H, ArH), 7.77–8.09 (m, 1H, ArH), 9.35 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 22.12 (2C), 55.32 ( $\text{CH}_3$ ), 44.94 ( $\text{CH}_2$ ), 25.60, 114.81 (2C), 117.42, 120.01 (2C), 122.71, 123.95, 124.65 (CH), 129.16, 148.63, 149.70, 155.35 (C), 170.87 (CONH);  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$  (299.37): ber. C 72.22, H 7.07, N 4.68, gef. C 71.88, H 7.33, N 4.52; MS (EI):  $m/z$  (%) = 299.1 [ $\text{M}^+$ ] (48), 215.1 [ $\text{M}^+ - 84$ ] (23), 200.1 [ $\text{M}^+ - 99$ ] (41), 176.1 [ $\text{M}^+ - 123$ ] (100); HPLC (isokratisch): 98.5% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.37 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 248; HPLC (Gradient): 98.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.47 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]propanamid (**43n**)

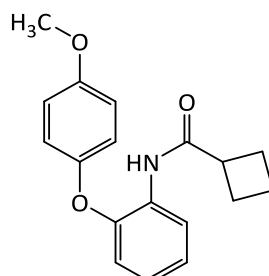
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Propionylchlorid (145  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) umgesetzt. Im Anschluss wurde aus Ethanol (70%) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 379 mg (1.40 mmol, 93%) in Form farbloser Kristalle erhalten.

Schmp.: 107–109 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3299 (m, br), 1651 (s, C=O);  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.02 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.35 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.70–6.79 (m, 1H, ArH), 6.90–7.09 (m, 6H, ArH), 7.87–8.10 (m, 1H, ArH), 9.33 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 9.68, 55.39 (CH<sub>3</sub>), 29.09 (CH<sub>2</sub>), 114.89 (2C), 117.23, 120.24 (2C), 122.70, 123.53, 124.45 (CH), 129.26, 148.49, 149.64, 155.48 (C), 172.28 (CONH); C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (271.32): ber. C 70.83, H 6.32, N 5.16, gef. C 70.70, H 6.37, N 5.12; MS (EI):  $m/z$  (%) = 271.1 [ $\text{M}^+$ ] (54), 215.1 [ $\text{M}^+$ -59] (100), 200.0 [ $\text{M}^+$ -71] (82), 148.1 [ $\text{M}^+$ -123] (25); HPLC (isokratisch): 98.6% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.89 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 239; HPLC (Gradient): 97.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.41 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]cyclopropancarboxamid (**43o**)

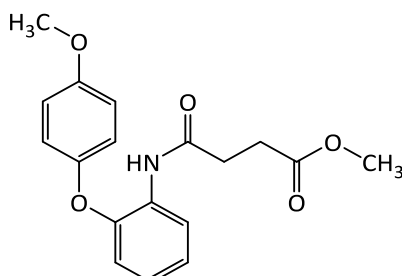
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Cyclopropancarbonylchlorid (150  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurde das Produkt als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 360 mg (1.27 mmol, 85%) isoliert.

Schmp.: 138–139 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3312 (m, br, N-H), 1660 (s, C=O);  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.65–0.87 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.95–2.14 (m, 1H, CH), 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.64–6.81 (m, 1H, ArH), 6.88–7.06 (m, 6H, ArH), 7.88–8.05 (m, 1H, ArH), 9.69 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 55.39 ( $\text{CH}_3$ ), 7.25 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 14.02, 114.93 (2C), 116.93, 120.47 (2C), 122.57, 123.38, 124.32 (CH), 129.21, 148.38, 149.54, 155.56 (C), 172.04 (CONH);  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$  (283.33): ber. C 72.07, H 6.05, N 4.94, gef. C 71.86, H 6.20, N 4.93; MS (EI):  $m/z$  (%) = 283.1 [ $\text{M}^+$ ] (43), 215.1 [ $\text{M}^+ - 68$ ] (100), 200.0 [ $\text{M}^+ - 83$ ] (52), 160.1 [ $\text{M}^+ - 123$ ] (32); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.79 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 247; HPLC (Gradient): 98.6% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.73 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

*N*-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]cyclobutancarboxamid (**43p**)

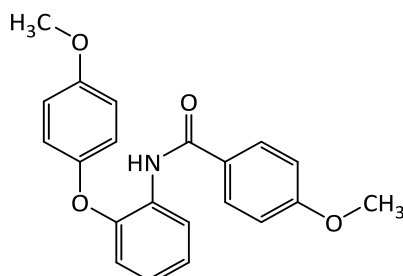
Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Cyclobutancarbonsäurechlorid (190  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurde das Produkt als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 378 mg (1.27 mmol, 85%) erhalten.

Schmp.: 72–74 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3294 (m, br, N-H), 1665 (s, C=O);  $^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.82–2.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.13–2.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.28–2.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.08–3.29 (m, 1H, CH), 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.74 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, ArH), 6.84–7.01 (m, 5H, ArH), 7.06 (td,  $J$  = 7.8 Hz,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.71 (s, 1H, NH), 8.47 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm] = 55.67 ( $\text{CH}_3$ ) 18.02, 25.32 (2C) ( $\text{CH}_2$ ), 41.10, 114.99 (2C), 116.31, 120.29 (2C), 120.51, 123.35, 123.54 (CH) 129.29, 146.55, 149.48, 156.21 (C), 173.22 (CONH);  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$  (283.33): ber. C 72.07, H 6.05, N 4.94, gef. C 71.86, H 6.20, N 4.93; MS (EI):  $m/z$  (%) = 297.1 [ $\text{M}$ ] $^+$  (38) 215.1 [ $\text{M}^+ - 82$ ] (100), 200.0 [ $\text{M}^+ - 97$ ] (40), 174.1 [ $\text{M}^+ - 123$ ] (27); HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.15 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 248; HPLC (Gradient): 98.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.93 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.28 min.

4-{[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]amino}-4-oxobutansäuremethylester (**43g**)

Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), Bernsteinsäuremethylesterchlorid (202  $\mu$ L, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Methanol wurde das Produkt in einer Ausbeute von 347 mg (1.05 mmol, 70%) in Form hellgelber Kristalle isoliert.

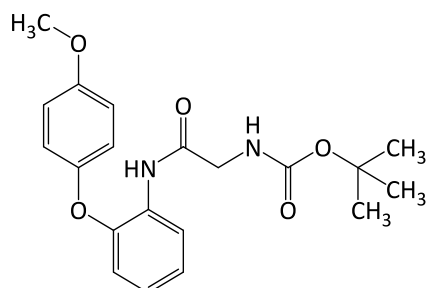
Schmp.: 82–83 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3335 (m, br, N-H), 1721 (s, C=O, Ester), 1682 (s, C=O, Amid);  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.55 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.66 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.58 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.67–6.80 (m, 1H, ArH), 6.86–7.12 (m, 6H, ArH), 7.84–8.05 (m, 1H, ArH), 9.52 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 51.27, 55.39 ( $\text{CH}_3$ ), 28.61, 30.62 ( $\text{CH}_2$ ), 114.90 (2C), 117.00, 120.43 (2C), 122.60, 123.19, 124.41 (CH), 129.06, 148.39, 149.54, 155.54 (C), 170.19, 172.77 (C=O);  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5$  (329.35): ber. C 65.64, H 5.82, N 4.25, gef. C 65.52, H 5.91, N 4.12; MS (EI):  $m/z$  (%) = 329.1 [ $\text{M}]^+$  (32), 297.1 [ $\text{M}^+-32$ ] (100), 215.1 [ $\text{M}^+-114$ ] (77), 200.1 [ $\text{M}^+-129$ ] (45), 174.0 [ $\text{M}^+-155$ ] (52); HPLC (isokratisch): 98.0% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.39 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 245; HPLC (Gradient): 97.4% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.20 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

4-Methoxy-N-[2-(4-methoxyphenoxy)phenyl]benzamid (**43r**)

Nach AAV1 wurden 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (380 mg, 1.50 mmol), 4-Methoxybenzoylchlorid (281 mg, 1.65 mmol) und Triethylamin (555  $\mu$ L, 4.00 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Methanol wurde das Produkt in einer Ausbeute von 344 mg (0.985 mmol, 66%) in Form farbloser Nadeln isoliert.

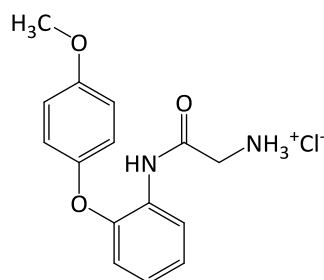
Schmp.: 88–89 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3442 (m, N-H), 1674 (s, C=O);  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.72 (s, 3H, OCH), 3.82 (s, 3H, OCH), 6.80–6.88 (m, 1H, ArH), 6.90–6.96 (m, 2H, ArH), 6.96–7.04 (m, 4H, ArH), 7.06–7.20 (m, 2H, ArH), 7.76 (dd,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.84–7.93 (m, 2H, ArH), 9.61 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 55.37 (2C, CH<sub>3</sub>), 113.57 (2C), 114.88 (2C), 117.63, 120.08 (2C), 122.78, 125.89, 126.05, 129.45 (2C) (CH), 126.48, 128.93, 149.69, 150.56, 155.44, 161.87 (CH), 164.68 (CONH); C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> (349.39): ber. C 72.19, H 5.48, N 4.01, gef. C 72.01, H 5.46, N 3.90; MS (EI):  $m/z$  (%) = 349.1 [ $\text{M}^+$ ] (20), 226.1 [ $\text{M}^+ - 123$ ] (35), 135.0 [ $\text{M}^+ - 214$ ] (100); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.71 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 268; HPLC (Gradient): 98.8% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.78 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.28 min.



*tert*-Butyl-*N*-{2-[(2-(4-methoxyphenoxy)phenyl)amino]-2-oxoethyl}carbamat (**43s**)

Nach AAV2 wurde eine Lösung aus Boc-geschütztem Glycin (350 mg, 2.00 mmol), PyBOP (1.09 g, 2.09 mmol), DIPEA (800  $\mu$ L, 4.59 mmol) und 2-(4-Methoxyphenoxy)anilin-Hydrochlorid (503 mg, 2.00 mmol), gelöst in getrocknetem Dichlormethan (5 mL) unter Zusatz von DIPEA (400  $\mu$ L, 2.30 mmol), in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) umgesetzt. Der nach dem Einengen im Vakuum zurückbleibende Rückstand wurde mit kaltem Diethylether (15 mL) versetzt, wodurch sich ein grau-beiger Feststoff absetzte, welcher abfiltriert und verworfen wurde. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand aus Methanol/Wasser (5:1) umkristallisiert. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 495 mg (1.33 mmol, 66%) als beiger Feststoff erhalten.

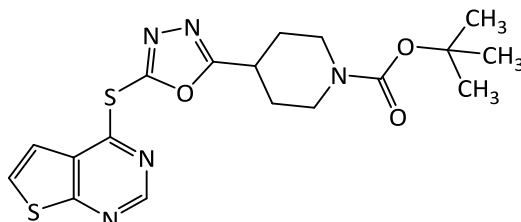
Schmp.: 92–93 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3393 (w, N-H), 3313 (s, br, N-H), 1696 (s, C=O, Urethan), 1666 (s, C=O, Amid);  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.35 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.73–3.75 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 6.73 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, ArH), 6.95–7.07 (m, 6H, ArH), 7.24 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, ArH), 8.13 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 28.02 (3C), 55.33 ( $\text{CH}_3$ ), 44.06 ( $\text{CH}_2$ ), 114.92 (2C), 116.55, 120.52 (2C), 121.58, 122.67, 124.19 (CH), 78.22 128.63, 147.69, 149.16, 155.65, 155.90 (C), 168.43 (CONH);  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$  (372.42): ber. C 64.50, H 6.50, N 7.52, gef. C 64.10, H 6.68, N 7.61; MS (EI):  $m/z$  (%) = 372.2 [ $\text{M}^+$ ] (18), 215.1 [ $\text{M}^+ - 157$ ] (100); HPLC (isokratisch): 96.5% bei 254 nm und 95.5% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.41 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 241; HPLC (Gradient): 95.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.99 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.28 min.

2-{N-[2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl]amino}-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**43t**)

Nach AAV5 wurde eine Lösung von *tert*-Butyl-*N*-{2-[(2-(4-methoxyphenoxy)phenyl)amino]-2-oxoethyl}carbammat (**43s**) (250 mg, 0.671 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (15 mL) mit Trifluoressigsäure (0.50 mL, 6.5 mmol) umgesetzt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 189 mg (0.612 mmol, 91%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 249–250 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3434 (m, br, N-H, Ammonium), 3114 (m, N-H, Amid), 1680 (s, C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.76 (s, 2H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.72–6.77 (m, 1H, ArH), 6.95–7.04 (m, 4H, ArH), 7.05–7.13 (m, 2H, ArH), 7.88–8.14 (m, 1H, ArH), 8.26 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 10.11 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 55.35 (CH<sub>3</sub>), 40.85 (CH<sub>2</sub>), 114.95 (2C), 116.75, 120.73 (2C), 122.61, 122.82, 125.16 (CH), 127.88, 148.66, 149.11, 155.69 (C), 165.28 (CONH); C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·HCl (308.76): ber. C 58.35, H 5.55, N 9.07, gef. C 58.28, H 5.52, N 8.82; MS (EI): *m/z* (%) = 272.1 [M<sub>freie Base</sub>]<sup>++</sup> (55), 200.1 [M<sup>+</sup>-72] (100), 148.0 [M<sup>+</sup>-124] (24); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 7.89 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 20:80),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 229.

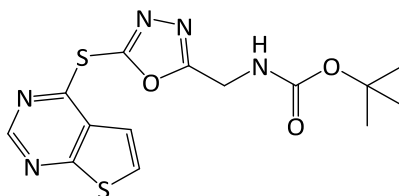
4-[5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**44n**)



Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.880 mmol), 4-(5-(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**65a**) (285 mg, 0.999 mmol) und Triethylamin (0.14 L, 1.0 mmol) in DMF (2.5 mL) für 20 min bei 90 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (100 W) umgesetzt. Danach wurde aus Methanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 184 mg (0.439 mmol, 50%) in Form hellgelber Kristalle erhalten.

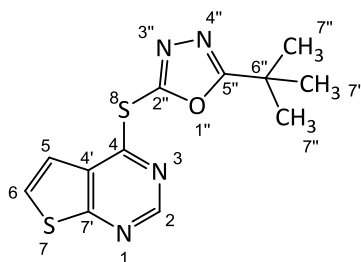
Schmp.: 139–140 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1691 (C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.55–1.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.97–2.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.90 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.14 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.84 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), (Das Signal des CH im Piperidinring befindet sich hinter dem Wasser-Peak zwischen 3.31 und 3.36 ppm und kann deshalb nicht integriert werden); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 28.04 (3C, CH<sub>3</sub>), 28.39 (2C), 41.89 (2C) (CH<sub>2</sub>), 32.40, 118.70, 130.44, 152.52 (CH), 78.83, 127.44, 130.44, 153.84, 156.17, 158.48, 167.08, 172.58 (C); C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (419.52): ber. C 51.53, H 5.05, N 16.69, gef. C 51.45, H 4.99, N 16.62; MS (EI): *m/z* (%) = 419.1 [M<sup>+</sup>] (2), 152.1 [M<sup>+</sup>-267] (100); HPLC (isokratisch): 99.1% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 7.10 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 231, 284; HPLC (Gradient): 99.3%, *t*<sub>M+S</sub> = 12.10 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

{[5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methyl}carbamidsäure-*tert*-butylester (**44o**)



Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.880 mmol), [(5-(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl]carbamidsäure-*tert*-butylester (**65b**) (231 mg, 0.999 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in DMF (2.5 mL) für 40 min bei 90 °C unter Mikrowellenbestrahlung (100 W) umgesetzt. Danach wurde aus Ethanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 123 mg (0.337 mmol, 38%) als beige Kristalle erhalten.

Schmp.: 153–154 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3369 (N-H), 1689 (C=O); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.37 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.47 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 8.14 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.83 (s, 1H, CH (Pyrimidin)); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 28.08 (3C, CH<sub>3</sub>), 35.56 (CH<sub>2</sub>), 118.76, 130.52, 152.47 (CH), 78.78, 127.56, 155.52, 156.52, 158.28, 167.15, 168.86 (C); C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (365.43): ber. C 46.02, H 4.14, N 19.17, gef. C 46.07, H 4.21, N 19.12; MS (EI): *m/z* (%): 209.0 (100); HPLC (isokratisch): 98.7% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.09 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 231, 284; HPLC (Gradient): 96.6%, *t*<sub>M+S</sub> = 10.26 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

2-(*tert*-Butyl)-5-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol (**44p**)

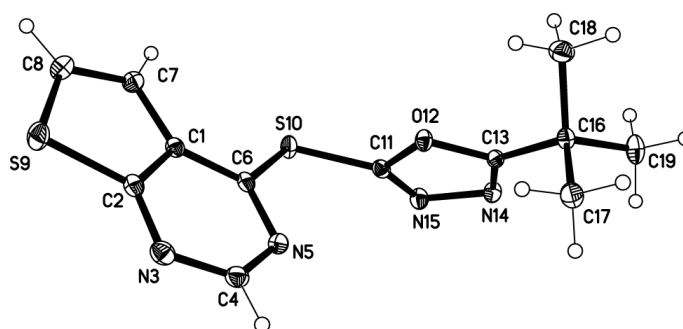
\*Die Nummerierung der Atome dient der Zuordnung der NMR-Signale und entspricht nicht den Regularien nach IUPAC

Methode A: Nach AAV3 wurde eine Lösung von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (158 mg, 0.999 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.884 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in Propan-2-ol (5 mL) für 45 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (EA/PE 1:4 → 1:3) und nachfolgende Umkristallisation aus Ethylacetat/Petrolether (1:5) gereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 39 mg (0.13 mmol, 15%) als farbloser Feststoff erhalten.

Methode B: Es wurde eine Lösung von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (158 mg, 0.999 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.884 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in einem Gemisch aus Propan-2-ol (2 mL) und DMF (0.5 mL) für 40 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) erhitzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (EA/PE 1:4) wurde das Produkt in einer Ausbeute von 97 mg (0.33 mmol, 38%) in Form hellgelber Kristalle erhalten.

Methode C: Nach AAV4 wurde eine Lösung von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (111 mg, 0.702 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Triethylamin (0.10 mL, 0.72 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) erhitzt. Zur Reinigung wurde aus Ethylacetat umkristallisiert, wobei Kristalle entstanden, die mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden konnten. Die Röntgenkristallstruktur wurde von Herrn Prof. Dr. Peter G. Jones angefertigt.

Schmp.: 129–130 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3069 (=C-H), 2972 (-C-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.47 (s, 9H, H-7''), 7.34 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.64 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.76 (s, 1H, H-2); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.77 (C-7'') (CH<sub>3</sub>), 118.05, 128.21, 152.37 (C-2) (CH), 32.72 (C-6''), 127.61 (C-4'), 156.16 (C-2'), 158.78 (C-4), 167.38 (C-7'), 177.32 (C-5'') (C); C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub> (292.38): ber. C 49.30, H 4.14, N 19.16, gef. C 49.69, H 3.97, N 19.12; MS (EI):  $m/z$  (%) = 292.1 [M]<sup>+</sup> (11), 209.0 [M<sup>+</sup>-83] (100); HPLC (isokratisch): 99.6% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 5.29 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{max}$  [nm] = 234, 284; HPLC (Gradient):  $t_{M+S}$  = 11.60 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.28 min.



**Abbildung 9-1:** Darstellung der Röntgenkristallstruktur von **44p**. Die Nummerierung der Atome entspricht nicht den Regularien gemäß IUPAC.

**Tabelle 9-1:** Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS <sub>2</sub>
M <sub>r</sub>	292.38
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	C2/c
Gitterkonstanten	a = 16.8835(8) Å    α = 90° b = 11.3347(4) Å    β = 106.216(5)° c = 14.2477(7) Å    γ = 90°
Volumen	2618.1(2) Å <sup>3</sup>
Z	8
Dichte (berechnet)	1.484 Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	0.403 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1216
Kristallgröße	0.4 x 0.2 x 0.2 mm <sup>3</sup>
Θ-Bereich für die Datensammlung	2.19 to 31.10°

Limitierende Indices	-24<=h<=22, -16<=k<=16, -20<=l<=20
Zahl der Reflexe	34143
Unabhängige Reflexe	3969 [R(int) = 0.0487]
Vollständigkeit bis $\Theta = 30.00^\circ$	98.0%
Absorptionskorrektur	<i>Semi-empirical from equivalents</i>
Max. und min. Transmission	1.00000 und 0.94434
Verfeinerungsmethode	<i>Full-matrix least-squares on F<sup>2</sup></i>
Daten/Einschränkungen/Parameter	3969 / 0 / 175
<i>Goodness-of-fit on F<sup>2</sup></i>	1.069
Finale R Indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0332, wR2 = 0.0748
R Indices (alle Daten)	R1 = 0.0431, wR2 = 0.0805
Größte Differenzpeaks	0.476 und -0.319 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabelle 9-2:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$ -Tensors.<sup>a</sup>

	x	y	z	U(eq)
C(1)	5813.6(7)	-356.0(10)	4360.8(9)	11.1(2)
C(2)	5114.5(8)	-979.9(11)	3811.9(9)	12.3(2)
N(3)	4417.4(7)	-476.4(10)	3272.2(8)	15.1(2)
C(4)	4436.9(8)	696.2(11)	3278.5(9)	14.8(2)
N(5)	5050.6(7)	1404.8(9)	3779.5(8)	13.6(2)
C(6)	5724.3(7)	870.8(10)	4320.4(9)	11.1(2)
C(7)	6476.6(8)	-1120.7(11)	4840.8(9)	13.7(2)
C(8)	6269.9(8)	-2269.2(11)	4651.9(10)	16.9(3)
S(9)	5279.5(2)	-2484.5(3)	3905.2(2)	17.3(1)
S(10)	6530.3(2)	1732.9(3)	5069.0(2)	13.5(1)
C(11)	6414.7(7)	3049.2(11)	4419.9(9)	11.6(2)
O(12)	6475.5(5)	3073.3(7)	3484.3(6)	11.9(2)
C(13)	6511.2(7)	4257.7(10)	3315.2(9)	10.6(2)
N(14)	6484.8(7)	4881.7(9)	4065.4(8)	13.4(2)
N(15)	6412.1(7)	4079.5(9)	4794.5(8)	14.1(2)
C(16)	6552.6(7)	4666.6(10)	2331.2(9)	11.6(2)
C(17)	5705.1(8)	4466.0(12)	1595.2(9)	16.3(2)
C(18)	7215.3(8)	3966.6(12)	2019.5(10)	18.5(3)
C(19)	6774.9(9)	5979.0(11)	2401.1(10)	17.9(3)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-3:** Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]<sup>a</sup>

C(1)-C(6)	1.3981(16)	S(10)-C(11)	1.7375(12)
C(1)-C(2)	1.4103(17)	C(11)-N(15)	1.2846(16)
C(1)-C(7)	1.4300(17)	C(11)-O(12)	1.3656(14)

C(2)-N(3)	1.3405(16)	O(12)-C(13)	1.3682(14)
C(2)-S(9)	1.7272(13)	C(13)-N(14)	1.2928(16)
N(3)-C(4)	1.3295(17)	C(13)-C(16)	1.4967(17)
C(4)-N(5)	1.3472(16)	N(14)-N(15)	1.4115(14)
N(5)-C(6)	1.3284(16)	C(16)-C(19)	1.5306(17)
C(6)-S(10)	1.7702(12)	C(16)-C(18)	1.5349(18)
C(7)-C(8)	1.3552(18)	C(16)-C(17)	1.5365(17)
C(8)-S(9)	1.7303(14)		

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-4:** Bindungswinkel [°]<sup>a</sup>

C(6)-C(1)-C(2)	114.33(11)	N(15)-C(11)-O(12)	113.41(10)
C(6)-C(1)-C(7)	133.12(11)	N(15)-C(11)-S(10)	124.92(10)
C(2)-C(1)-C(7)	112.55(11)	O(12)-C(11)-S(10)	120.59(9)
N(3)-C(2)-C(1)	124.71(11)	C(11)-O(12)-C(13)	102.16(9)
N(3)-C(2)-S(9)	124.15(9)	N(14)-C(13)-O(12)	112.20(10)
C(1)-C(2)-S(9)	111.13(9)	N(14)-C(13)-C(16)	128.79(11)
C(4)-N(3)-C(2)	113.93(11)	O(12)-C(13)-C(16)	118.99(10)
N(3)-C(4)-N(5)	127.84(12)	C(13)-N(14)-N(15)	106.63(10)
C(6)-N(5)-C(4)	116.30(11)	C(11)-N(15)-N(14)	105.59(10)
N(5)-C(6)-C(1)	122.83(11)	C(13)-C(16)-C(19)	108.35(10)
N(5)-C(6)-S(10)	119.19(9)	C(13)-C(16)-C(18)	109.85(10)
C(1)-C(6)-S(10)	117.92(9)	C(19)-C(16)-C(18)	109.63(10)
C(8)-C(7)-C(1)	111.32(11)	C(13)-C(16)-C(17)	108.37(10)
C(7)-C(8)-S(9)	114.12(10)	C(19)-C(16)-C(17)	110.67(10)
C(2)-S(9)-C(8)	90.88(6)	C(18)-C(16)-C(17)	109.95(10)
C(11)-S(10)-C(6)	101.54(6)	N(15)-C(11)-O(12)	113.41(10)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-5:** Torsionswinkel [°]<sup>a</sup>

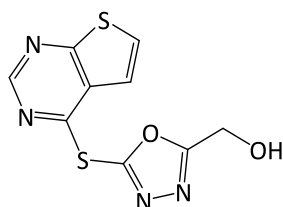
C(6)-C(1)-C(2)-N(3)	1.24(18)	N(5)-C(6)-S(10)-C(11)	-28.96(11)
C(7)-C(1)-C(2)-N(3)	-178.20(11)	C(1)-C(6)-S(10)-C(11)	153.85(9)
C(6)-C(1)-C(2)-S(9)	-179.94(9)	C(6)-S(10)-C(11)-N(15)	132.85(11)
C(7)-C(1)-C(2)-S(9)	0.63(13)	C(6)-S(10)-C(11)-O(12)	-59.80(10)
C(1)-C(2)-N(3)-C(4)	1.06(18)	N(15)-C(11)-O(12)-C(13)	0.00(13)
S(9)-C(2)-N(3)-C(4)	-177.62(10)	S(10)-C(11)-O(12)-C(13)	-168.71(9)
C(2)-N(3)-C(4)-N(5)	-2.46(19)	C(11)-O(12)-C(13)-N(14)	0.67(13)
N(3)-C(4)-N(5)-C(6)	1.26(19)	C(11)-O(12)-C(13)-C(16)	-177.89(10)
C(4)-N(5)-C(6)-C(1)	1.49(17)	O(12)-C(13)-N(14)-N(15)	-1.04(13)
C(4)-N(5)-C(6)-S(10)	-175.56(9)	C(16)-C(13)-N(14)-N(15)	177.35(11)
C(2)-C(1)-C(6)-N(5)	-2.57(17)	O(12)-C(11)-N(15)-N(14)	-0.59(14)



C(7)-C(1)-C(6)-N(5)	176.71(12)	S(10)-C(11)-N(15)-N(14)	167.55(9)
C(2)-C(1)-C(6)-S(10)	174.51(8)	C(13)-N(14)-N(15)-C(11)	0.98(13)
C(7)-C(1)-C(6)-S(10)	-6.21(19)	N(14)-C(13)-C(16)-C(19)	13.87(17)
C(6)-C(1)-C(7)-C(8)	-179.43(13)	O(12)-C(13)-C(16)-C(19)	-167.85(10)
C(2)-C(1)-C(7)-C(8)	-0.14(15)	N(14)-C(13)-C(16)-C(18)	133.59(13)
C(1)-C(7)-C(8)-S(9)	-0.42(14)	O(12)-C(13)-C(16)-C(18)	-48.12(14)
N(3)-C(2)-S(9)-C(8)	178.11(11)	N(14)-C(13)-C(16)-C(17)	-106.26(14)
C(1)-C(2)-S(9)-C(8)	-0.72(10)	O(12)-C(13)-C(16)-C(17)	72.02(13)
C(7)-C(8)-S(9)-C(2)	0.67(11)		

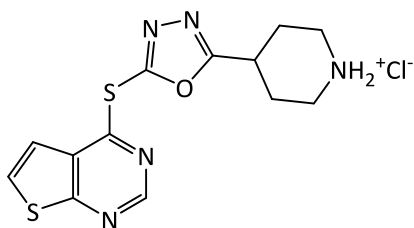
<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

#### 5-Hydroxymethyl-2-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol (**44g**)



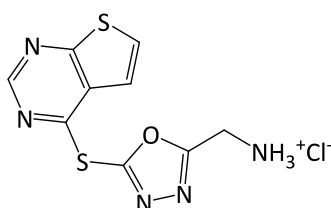
Nach AAV4 wurde eine Suspension von 5-Hydroxymethyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65f**) (195 mg, 1.48 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (204 mg, 1.20 mmol) und Triethylamin (0.21 mL, 1.5 mmol) in Propan-2-ol (4 mL) für 30 min bei 120 °C unter Mikrowellenbestrahlung (200 W) umgesetzt. Zur Reinigung wurde eine Säulenchromatographie auf Kieselgel (Laufmittel: PE/EA 5:3 → 1:1 → 1:2 → 0:1) durchgeführt und anschließend aus Ethylacetat auskristallisiert. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 42 mg (0.16 mmol, 13%) in Form feiner farbloser Nadeln erhalten.

Schmp.: 156–157 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3304 (s, O-H), 3097 (m, =C-H), 2929 (w, -C-H) ; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 4.75 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, OH), 7.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.85 (s, 1H, CH (Pyrimidin)); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 53.87 (CH<sub>2</sub>), 118.75, 130.49, 152.54 (CH), 127.52, 156.63, 167.11, 170.26 (C); C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (266.29): ber. C 40.59, H 2.27, N 21.04, gef. C 40.59, H 2.02, N 20.77; MS (EI): *m/z* (%): 266.0 [M]<sup>+</sup> (10), 209.0 [M<sup>+</sup>-57] (100); HPLC (isokratisch): 96.2% bei 254 nm und 95.7% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 2.98 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 25:75),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 236, 286; HPLC (Gradient): 97.0% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 7.51 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.26 min.

4-[5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]piperidin-1-iumchlorid (**44r**)

Nach AAV6 wurde eine Lösung von 4-[5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**44n**) (150 mg, 0.358 mmol) und Trifluoressigsäure (870  $\mu$ L, 11.3 mmol) in Dichlormethan (20 mL) 18 h bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Es wurde aus Ethanol umkristallisiert und das Produkt als hellbeiger Feststoff mit einer Ausbeute von 47 mg (0.13 mmol, 37%) erhalten.

Schmp.: 217–219 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3400 (m, br, N-H), 2851 (m, -C-H);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.92–2.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17–2.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.06 (t,  $J$  = 12.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.24–3.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.46–3.61 (m, 1H, CH), 7.66 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.16 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.84 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 8.92 (s, 1H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 9.07 (s, 1H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 25.22 (2C), 41.86 (2C) (CH<sub>2</sub>), 30.28, 118.74, 130.53, 152.50 (CH), 127.47, 156.51, 158.45, 167.10, 171.68 (C); MS (EI):  $m/z$  (%) = 319.0 [ $M_{\text{freie Base}}^+$ ] (3), 210.0 [ $M^+ - 109$ ] (100); HRMS (EI): ber. für C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub> 319.05560, gef. 319.05490; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.71 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 15:85),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 232, 286.

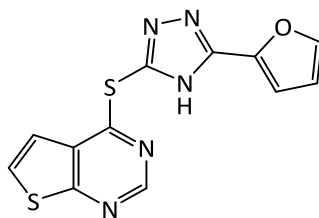
[5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methanaminiumchlorid (**44s**)

Die Darstellung erfolgte nach AAV6 aus [5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methylcarbamidsäure-*tert*-butylester (**44o**) (90 mg, 0.25 mmol) und

Trifluoressigsäure (0.57 mL, 2.5 mol) in Dichlormethan (10 mL) unter Stickstoffatmosphäre und Rühren bei RT für insgesamt 25 h. Dabei wurde die Trifluoressigsäure in drei gleichgroßen Portionen (je 0.19 mL) zu Beginn der Reaktion, nach 3 h und nach 18 h Reaktionszeit zugegeben. Das Produkt wurde aus Ethanol/Petrolether (1:2, 15 mL) auskristallisiert und in einer Ausbeute von 20 mg (0.066 mmol, 27%) als hellbeiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 176–180 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3400 (s, br, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 4.56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.69 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.18 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.85 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 8.93 (br, s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, austauschbar); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 33.65 (CH<sub>2</sub>), 118.86, 130.75, 152.48 (CH), 127.81, 157.73, 157.85, 165.22, 167.29 (C); MS (EI): *m/z* (%) = 265.0 [M<sub>frei Base</sub>]<sup>+</sup> (9), 209.0 [M<sup>+</sup>-54] (100); HRMS (EI): ber. für C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub> 265.00865, gef. 265.00915 HPLC (isokratisch): 98.8% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.73 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 10:90),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 242, 286.

5-(Furan-2-yl)-3-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,2,4-triazol (**44t**)

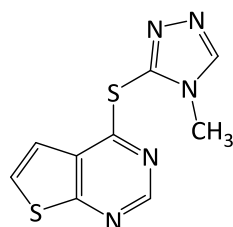


Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol), 5-(Furan-2-yl)-1,2,4-triazol-3(4*H*)-thion (104 mg, 0.622 mmol) und Triethylamin (84  $\mu$ L, 0.61 mmol) in DMF (2 mL) für 40 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Im Anschluss wurde aus Methanol/Wasser (1:1) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 130 mg (0.431 mmol, 72%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 167–168 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3430 (w, br, N-H), 1512 (s); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 6.66, 6.75 (2s, br, 2H, ArH), 7.00, 7.18 (2s, br 1H), 7.38–7.71 (m, 2H, ArH), 7.77–8.18 (m, 4H, ArH), 8.72–8.89 (m, 4 Hz, 1H), 15.05, 15.19 (2s, br, 2H, NH, austauschbar), doppelter Signalsatz zweier Tautomere (Verhältnis ca. 1:0.4); <sup>13</sup>C-NMR:

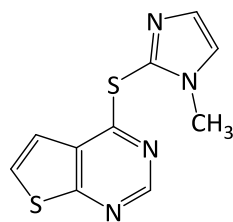
(151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 109.44, 111.68, 112.36, 118.79, 129.38, 129.63, 129.71, 130.01, 133.77, 133.86, 145.40, 152.54 (CH), 118.72, 127.34, 142.01, 142.54, 143.95, 145.87, 148.82, 151.82, 156.28, 161.72, 166.49, 166.72 (C), doppelter Signalsatz zweier Tautomere;  $C_{12}H_7N_5OS_2$  (301.34): ber. C 47.83, H 2.34, N 23.24, gef. C 47.90, H 2.10, N 22.85; MS (EI):  $m/z$  (%) = 301.0  $[M]^+$  (100), 180.0  $[M^+-121]$  (35), 135.0  $[M^+-166]$  (34); HPLC (isokratisch): 99.9% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 3.32 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 35:65),  $\lambda_{max}$  [nm] = 229, 263; HPLC (Gradient): 97.1% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 8.83 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

#### 4-Methyl-3-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,2,4-triazol (**44u**)



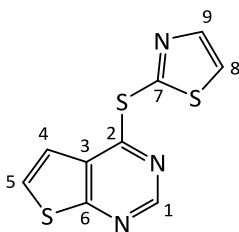
Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol), 3-Mercapto-4-methyl-1,2,4-triazol (145 mg, 1.26 mmol) und Triethylamin (166  $\mu$ L, 1.20 mmol) in DMF (3 mL) für 60 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Im Anschluss wurde aus Ethylacetat umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 22 mg (0.088 mmol, 15%) in Form hellgelber Kristalle erhalten.

Schmp.: 201–203 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3092 (w, =C-H), 2958 (w, -C-H), 1506 (s);  $^1H$ -NMR: (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.63 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.11 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.77 (s, 1H, ArH), 8.92 (s, 1H, ArH);  $^{13}C$ -NMR: (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 31.47 (CH<sub>3</sub>), 118.68, 129.84, 148.09, 152.54 (CH), 126.90, 141.98, 160.02, 166.62 (C);  $C_9H_7N_5S_2$  (249.31): ber. C 43.36, H 2.83, N 28.09, gef. C 43.46, H 2.74, N 27.81; MS (EI):  $m/z$  (%) = 249.0  $[M]^+$  (100), 135.0  $[M^+-114]$  (44); HPLC (isokratisch): 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 4.25 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 20:80),  $\lambda_{max}$  [nm] = 228, 287; HPLC (Gradient): 99.1% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 7.29 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

4-[1-Methyl-1*H*-imidazol-2-yl]thio]thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44v**)

Nach AAV3 wurde eine Lösung von 2-Mercapto-1-methylimidazol (114 mg, 0.999 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.880 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in Propan-2-ol (4 mL) für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Es folgte eine Umkristallisation aus Ethanol (50%) nach der das Produkt in einer Ausbeute von 70 mg (0.28 mmol, 32%) in Form feiner hellgelber Nadeln erhalten wurde.

Schmp.: 158–159 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3101, 3074, 3056, 3027 (=C-H), 2949 (-C-H) ; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] =  $\delta$  3.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.18 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, CH (Imidazol)), 7.32 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.61 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH (Imidazol)), 8.05 (d, *J* = 6.0, 1H, CH (Thiophen)), 8.76 (s, 1H, CH (Pyrimidin)); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 33.61 (CH<sub>3</sub>), 118.56, 126.20, 129.36, 130.11, 152.49 (CH), 126.64, 131.44, 162.17, 166.56 (C); C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (248.32): ber. C 48.37, H 3.25, N 22.56, gef. C 48.32, H 3.18, N 22.54; MS (EI): *m/z* (%) = 248.0 [M]<sup>+</sup> (99), 215.1 [M<sup>+</sup>-33] (100); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 5.91 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 16:84),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 239, 285.

2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3-thiazol (**44w**)

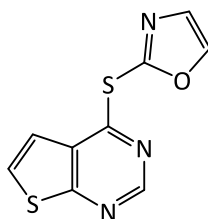
\* Die Nummerierung dient nur der Zuordnung von NMR-Signalen und folgt nicht den IUPAC-Regeln

Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (119 mg, 0.702 mmol), 1,3-Thiazol-2-thiol (73 mg, 0.62 mmol) und Triethylamin (0.10 mL, 0.72 mmol) in DMF (2 mL) für

30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) gerührt. Im Anschluss wurde aus Methanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 112 mg (0.446 mmol, 72%) in Form brauner Nadeln erhalten.

Schmp.: 132–133 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3100 (w), 1512 (s); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.59 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.06 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-9), 8.09–8.14 (m, 2H, CH (Thiophen), H-8), 8.93 (s, 1H, H-1); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 118.62, 126.03 (C-8), 129.78, 143.40 (C-9), 152.13 (C-1) (CH), 126.87 (C-3), 152.70 (C-7), 159.76 (C-2), 166.46 (C-6) (C); C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S<sub>3</sub> (251.34): ber. C 43.01, H 2.01, N 16.72, gef. C 43.27, H 1.94, N 16.72; MS (EI): *m/z* (%) = 251.0 [M]<sup>+</sup> (100), 135.0 [M<sup>+</sup>-116] (43); HPLC (isokratisch): 98.7% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 5.07 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 45:55),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 231, 293; HPLC (Gradient): 98.8% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 10.95 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

#### 2-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3-oxazol (**44x**)

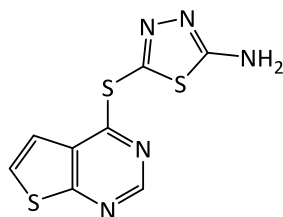


Nach AAV4 wurden 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (110 mg, 0.649 mmol), 1,3-Oxazol-2-thiol (59 mg, 0.58 mmol) und Triethylamin (90  $\mu$ L, 0.65 mmol) in DMF (2 mL) für 60 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) gerührt. Im Anschluss wurde aus Methanol (50%) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 28 mg (0.12 mmol, 21%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 89–90 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1512 (s); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.49 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.58 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, CH (Oxazol)), 8.11 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.52 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, CH (Oxazol)), 8.82 (s, 1H, CH(Pyrimidin)); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 118.60, 130.09, 130.28, 145.38, 152.53, (CH), 127.21, 150.25, 160.12, 166.86 (C); C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub> (235.29): ber. C 45.95, H 2.14, N 17.86, gef. C 46.23, H 2.19, N 17.81; MS (EI): *m/z* (%) = 235.0 [M]<sup>+</sup> (100),

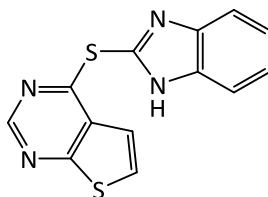
135.0 [M<sup>+</sup>-100] (82); HPLC (isokratisch): 97.2% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 4.69 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 35:65),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 231, 286; HPLC (Gradient): 95.9% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 9.48 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

5-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (**44y**)



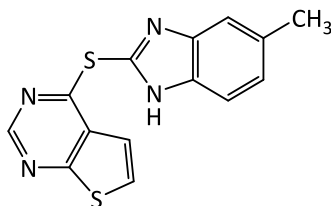
Eine Suspension von 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-thiol (102 mg, 0.766 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Kaliumcarbonat (101 mg, 0.731 mmol) in DMF (5 mL) wurde 18 h bei Raumtemperatur und 5 h bei 50 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Eis geleert. Der präzipitierte Feststoff wurde filtriert, in Ethylacetat/Methanol (5:1, 36 mL) aufgenommen und 1 h zum Rückfluss erhitzt. Es wurde in der Hitze filtriert und das Produkt in einer Ausbeute von 57 mg (0.21 mmol, 36%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 219–220 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3257 (m, br, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.59 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.74 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.09 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.89 (s, 1H, CH (Thiophen)); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 118.59, 129.70, 152.33 (CH), 126.85, 140.46, 160.32, 166.49, 173.23 (C); C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>S<sub>3</sub> (267.34): ber. C 35.94, H 1.89, N 26.20, gef. C 35.95, H 1.74, N 26.11; MS (EI): *m/z* (%) = 267.0 [M]<sup>+</sup> (20), 225.0 [M-42]<sup>+</sup> (100); HPLC (isokratisch): 99.7% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 8.11 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 20:80),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 231, 289; HPLC (Gradient): 99.2%,  $t_{M+S}$  = 8.20 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.28 min.

4-[(Benzimidazol-2-yl)thio]thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44z**)

Nach AAV3 wurde eine Lösung von 2-Mercaptobenzimidazol (105 mg, 0.699 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Triethylamin (0.10 mL, 0.72 mmol) in DMF (2.5 mL) für 22 h bei 120 °C umgesetzt. Es folgte eine Umkristallisiert aus Aceton nach der das Produkte in einer Ausbeute von 35 mg (0.12 mmol, 18%) als beiger Feststoff erhalten wurde.

Schmp.: 217–220 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3434 (m, br, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.29 (br s, 2H, ArH), 7.49 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.50–7.82 (m, 2H, ArH), 8.08 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.82 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 13.25 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 118.82, 129.68, 152.58 (CH), 111.60, 119.26, 122.11, 123.57, 127.35, 135.66, 139.73, 143.59, 161.04, 166.67, mit Hilfe des DEPT-Experiments konnten nur die drei Signale des Thienopyrimidinrings zugeordnet werden; C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (284.36): ber. C 54.91, H 2.84, N 19.70, gef. C 54.65, H 2.82, N 19.67; MS (EI): *m/z* (%) = 284.0 [M]<sup>++</sup> (100), 226.0 [M<sup>+</sup>-58] (62); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 4.81 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 235, 289; HPLC (Gradient): 99.9%, *t*<sub>M+S</sub> = 10.7 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

4-[(5-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)thio]thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44aa**)

Nach AAV4 wurden 2-Mercapto-5-methylbenzimidazol (115 mg, 0.700 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Caesiumcarbonat (228 mg,

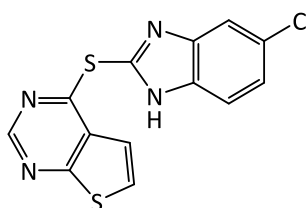


0.700 mmol) in DMF (2 mL) für 45 min bei 140 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Es folgte eine Umkristallisation aus Ethanol nach der das Produkt in einer Ausbeute von 52 mg (0.17 mmol, 29%) als beiger Feststoff erhalten wurde.

Schmp.: 243–244 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3430 (N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.93–6.96 (m, 1H, ArH), 6.97–7.04 (m, 2H, ArH), 7.08–7.17 (m, 2H, ArH), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.37–7.45 (m, 2H, ArH), 8.03–8.11 (m, 2H, ArH), 9.27 (2s, 2H, CH (Pyrimidin)), 13.24 (s, 2H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 20.86, 20.92 (CH<sub>3</sub>), 109.79, 110.18, 110.29, 110.64, 120.91, 121.00, 123.74, 124.98, 129.32, 129.45, 153.40, 153.47 (CH), 127.01, 127.24, 129.54, 130.64, 131.79, 132.57, 132.79, 133.80, 150.23, 150.26, 168.23, 168.31, 170.73, 170.75 (C), doppelter Signalsatz zweier Tautomere; C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (298.38): ber. C 56.36, H 3.38, N 18.78, gef. C 56.43, H 3.32, N 18.69; MS (EI): *m/z* (%) = 298.1 [M]<sup>+</sup> (100), 240.1 [M<sup>+</sup>-58] (95); HPLC (isokratisch): 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 4.19 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 227, 234, 304; HPLC (Gradient): 97.5% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 10.36 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.28 min.

Es liegt ein Gemisch aus zwei Tautomeren vor, das in etwa im Verhältnis 1:1 vorliegt.

#### 4-[(5-Chlor-1*H*-benzimidazol-2-yl)thio]thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44ab**)

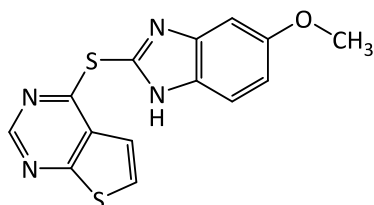


Nach AAV4 wurden 5-Chlor-2-mercaptobenzimidazol (130 mg, 0.704 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Diisopropylethylamin (0.12 mL, 0.69 mmol) in Propan-2-ol (2 mL) für 150 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Es folgte eine Umkristallisation aus Ethanol nach der das Produkt in einer Ausbeute von 53 mg (0.17 mmol, 28%) als beiger Feststoff erhalten wurde.

Schmp.: 188–190 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3430 (N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.32 (s, 1H, CH (Benzen)), 7.51 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.54–7.87 (m,

2H, CH (Benzen)), 8.09 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.83 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 13.44 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 118.84, 129.82, 152.57 (CH), 111.39, 113.08, 118.53, 119.70, 122.56, 123.76, 127.45, 130.72, 160.56, 166.74 (C);  $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{ClN}_4\text{S}_2$  (318.80): ber. C 48.98, H 2.21, N 17.57, gef. C 48.90, H 2.03, N 17.40; MS (EI):  $m/z$  (%) = 318.0 [ $\text{M}^+$ ] (100), 260.0 [ $\text{M}^+ - 58$ ] (76); HPLC (isokratisch): 96.7% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}} = 4.79$  min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.06$  min (ACN/Puffer $_{\text{pH } 2.7} = 50:50$ ),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 237, 301.

#### 4-[(5-Methoxy-1*H*-benzimidazol-2-yl)thio]thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44ac**)



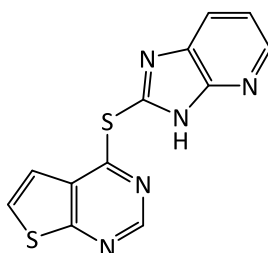
Nach AAV4 wurden 2-Mercapto-5-methoxybenzimidazol (126 mg, 0.699 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol) und Triethylamin (97  $\mu\text{L}$ , 0.70 mmol) in DMSO (2 mL) für 60 min bei 140 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Es wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (LM: Dichlormethan/Ethylacetat 1:1) gereinigt und das Produkt als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 21 mg (0.067 mmol, 11%) erhalten.

Schmp.: 151–153 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3430 (w, br, N-H), 3087 und 3050 (=C-H), 2949 (-C-H);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 3.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.89 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H, ArH), 6.95 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H, ArH), 7.01 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, ArH), 7.22 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, ArH), 7.41–7.49 (m, 3H, ArH), 7.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, ArH), 8.07 (dd,  $J = 6.0, 0.4$  Hz, 2H, ArH), 8.81 (s, 1H, ArH), 8.82 (s, 1H, ArH), 13.08 (s, 1H, NH), 13.14 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 55.46, 55.51 (CH<sub>3</sub>), 94.04, 101.08, 112.02, 112.26, 113.89, 118.75, 118.77, 119.84, 129.58, 129.61, 152.56 (2C) (CH), 127.14, 127.25, 130.22, 136.44, 137.53, 138.28, 139.16, 144.52, 155.56, 156.80, 161.29, 161.53, 166.62, 166.66 (C); doppelter Signalsatz zweier Tautomere; MS (EI):  $m/z$  (%): 314.0 [ $\text{M}^+$ ] (100); HRMS (EI): ber. 314.02905, gef. 314.02897; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}} = 4.34$  min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.06$  min (ACN/Wasser =

40:60),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 247, 298, 308; HPLC (Gradient): 97.9% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 10.50 min,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO})$  = 1.26 min.

Es liegt ein Gemisch aus zwei Tautomeren vor, das in etwa im Verhältnis 2:1 vorliegt.

4-(3*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-ylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidin (**44ad**)



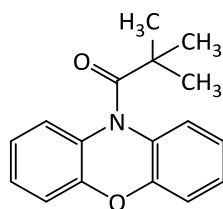
Ein Lösung von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol), 1*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67a**) (91 mg, 0.60 mmol) und Triethylamin (0.10 mL, 0.72 mmol) in DMF (2 mL) wurde für 24 h bei 120 °C gerührt. Nachdem die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde Wasser (20 mL) zugegeben und über Nacht bei 4 °C auskristallisiert. Der präzipitierte braune Feststoff wurde filtriert und per Säulenchromatographie (Toluen/EtOH 10:1) gereinigt. Der dann isolierte Feststoff wurde aus Petrolether/Toluen (4:3) umkristallisiert und in einer Ausbeute von 18 mg (0.063 mmol, 11%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 183–184 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3205 (w, br, N-H), 1512 (s); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.30–7.39 (m, 2H, ArH, CH(Pyridin)), 7.51–7.62 (m, 2H, CH (Thiophen)), 7.92–8.20 (m, 4H, ArH, CH(Pyridin), CH(Thiophen)), 8.34–8.56 (m, 2H, CH (Pyridin)), 8.78–8.90 (m, 2H, CH (Pyrimidin)), 13.50, 13.80 (2s, 2H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 118.5, 118.9 (2C), 119.0, 119.8, 127.0, 127.6, 127.7, 127.7, 127.9, 129.8, 129.9, 135.6, 142.5, 143.6, 144.6, 145.0, 149.2, 152.6, 155.6, 160.1, 160.5, 166.7, 166.8, doppelter Signalsatz zweier Tautomere, die Signale konnten mit Hilfe des DEPT-Experiments nicht eindeutig zugeordnet werden; MS (EI):  $m/z$  (%) = 285.0 [M]<sup>+</sup> (100), 227.0 [M<sup>+</sup>-58] (57), 135.0 [M<sup>+</sup>-150] (21); HRMS (EI): ber. für C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> 285.01374, gef. 285.01339; HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm,

$t_{M+S} = 3.14$  min,  $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$  min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 35:65),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 232, 302;  
HPLC (Gradient): 97.5% bei 254 nm,  $t_{M+S} = 9.34$  min,  $t_M(\text{DMSO}) = 1.28$  min.

Es liegt ein Gemisch aus zwei Tautomeren vor, das in etwa im Verhältnis 2:1 vorliegt.

2,2-Dimethyl-1-(10H-phenoxazin-10-yl)-propan-1-on (62)

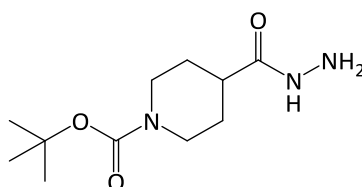


Zu einer Suspension von Phenoxazin (183 mg, 0.999 mmol) und Natriumhydrid (60%) (200 mg, 5.00 mmol) in DMF (4 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre und Kühlung auf dem Eisbad Pivaloylchlorid (148  $\mu\text{L}$ , 1.20 mmol), gelöst in DMF (0.5 mL), zugegeben. Nach langsamem Aufwärmen auf Raumtemperatur wurde weiteres DMF (5 mL) zugegeben und für 20 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf Eis (15 g) geleert, die wässrige Suspension mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert und anschließend die organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (LM: PE/EA 4:1) gereinigt. Anschließend wurde erneut mittels säulenchromatographischer Trennung (LM: DCM) gereinigt. Danach wurde das Produkt in Diethylether/Ethylacetat (1:1) aufgenommen und mit Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und erneut mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 52 mg (0.19 mmol, 19%) als grauer Feststoff erhalten.

Schmp.: 144–146 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 1660 (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 1.12 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 7.17 (ddd,  $J = 7.9, 6.9, 1.9$  Hz, 2H, ArH), 7.21–7.29 (m, 4H, ArH), 7.58 (dd,  $J = 7.9, 1.4$  Hz, 2H, ArH);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 28.94 (3C,  $\text{CH}_3$ ), 116.58 (2C), 123.76 (2C), 124.59 (2C), 126.92 (2C) (CH), 41.96, 131.70 (2C), 151.04 (2C) (C), 178.44 (C=O);  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$  (267.33): ber. C 76.38, H 6.41, N 5.24, gef. C 76.21, H 6.36, N 5.04; MS (EI):  $m/z$  (%) = 267.1 [ $\text{M}$ ] $^{+}$  (25), 183.1 [ $\text{M}^{+}-84$ ] (100); HPLC (isokratisch):

99.9% bei 254 nm und 96.9% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 2.83 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 70:30),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 244; HPLC (Gradient): 98.6%,  $t_{M+S}$  = 14.15 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.28 min.

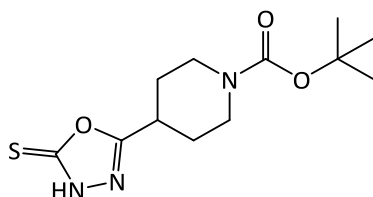
4-(Hydrazinocarbonyl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (64a)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von JANSEN *et al.*<sup>114</sup> Es wurde eine Suspension aus *N*-Boc-Piperidin-4-carbonsäureethylester (1.0 g, 3.9 mmol) und einer Hydrazinhydrat-Lösung (64%) (1.9 g, 39 mmol) hergestellt. Diese wurde 7 h unter Siedehitze gerührt. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Es präzipitierten farblose Kristalle, welche durch Filtration isoliert wurden. Zudem wurde das Filtrat mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Zurück blieb ein farbloser Feststoff, welcher mit dem vorher isolierten Feststoff vereinigt wurde. Zusammen ergab sich eine Ausbeute von 747 mg (3.1 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffs, der ohne weitere Reinigung zur weiteren Synthese verwendet wurde.

Schmp.: 103–104 °C, Lit.: 105 °C<sup>114</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.28–1.46 (m, 11H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1.48–1.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.11–2.34 (m, 1H, CH), 2.54–2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71–4.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.16 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.99 (s, 1H, NH); C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (243.31).

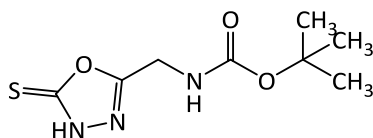
Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten der Literatur überein.<sup>114</sup>

4-(5(4H)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (65a)

Nach AAV8 wurde eine Lösung aus 4-(Hydrazinocarbonyl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**64a**) (700 mg, 2.88 mmol), Kaliumhydroxid (165 mg, 2.88 mmol) und Kohlenstoffdisulfid (575  $\mu$ L, 9.50 mmol) in Ethanol (5 mL) für 6.5 h zum Rückfluss erhitzt. Im Aufarbeitungsprozess wurde abweichend zu AAV8 mit Salzsäure (37%) auf pH 7 eingestellt. Es wurde aus Ethylacetat umkristallisiert und so das Produkt mit einer Ausbeute von 430 mg (1.51 mmol, 52%) als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmp.: 174–175 °C, Lit.: 182 °C<sup>114</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.61–1.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.84–2.31 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 2.60–3.17 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.84–4.34 (m, 2H, CH, CH<sub>2</sub>), 11.86 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 28.42 (3C, CH<sub>3</sub>), 28.14 (2C), 42.70 (2C) (CH<sub>2</sub>), 33.48 (CH), 80.48, 154.85, 165.78, 178.57 (C); C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (285.36).

Das <sup>1</sup>H-NMR zeigt ein Proton zu viel, die chemischen Verschiebungen stimmen allerdings mit den Daten der Literatur überein. Das <sup>13</sup>C-Spektrum stimmt eindeutig mit den Daten der Literatur überein.<sup>114</sup>

[(5(4H)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl]carbamidsäure-*tert*-butylester (65b)

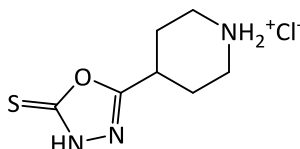
Eine Suspension von *N*-Boc-glycinmethylester (2.00 g, 10.5 mmol) in einer Hydrazinhydrat-Lösung (64%) (2.5 g, 50 mmol) wurde unter Rühren 7.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt war wurde das Gemisch 72 h bei 4 °C gelagert, wobei ein farbloser Feststoff präzipitierte. Dieser wurde abfiltriert und so das Hydrazid mit einer Rohausbeute von 1.36 g (7.18 mmol) erhalten. Dieses wurde ohne

Aufreinigung weiterverwendet und mit Kaliumhydroxid (0.40 g, 7.2 mmol) in Ethanol (15 mL) gelöst. Zur Lösung wurde Kohlenstoffdisulfid (1.43 mL, 23.7 mmol) zugegeben und 4.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem die Lösung 18 h bei Raumtemperatur gelagert wurde, wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Eiswasser (20 mL) versetzt und mit Essigsäure auf pH 3–4 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (4 x 5 mL) extrahiert, die Extrakte vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Das Produkt wurde als rotes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet. Es wurde in einer Ausbeute von 0.97 g (4.2 mmol, 40%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.38 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 4.21 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.57 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, CONH), 14.42 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 28.06 (3C,  $\text{CH}_3$ ), 35.38 ( $\text{CH}_2$ ), 78.79 (CH), 155.42, 161.73, 177.80 (C);  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  (231.27).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit jenen der Literatur überein.<sup>114</sup>

#### 4-(5-Thioxo-4,5-dihydro-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-iumchlorid (**65c**)

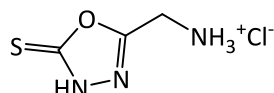


Eine Lösung von 4-(5(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**65a**) (640 mg, 2.24 mmol) in einem Gemisch aus Diethylether (10 mL) und Methanol (1.5 mL) wurde nach AAV7 unter Begasung mit Chlorwasserstoffgas umgesetzt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 481 mg (2.17 mmol, 97%) erhalten.

Schmp.: 230 °C (Zersetz.), Lit.: 232 °C<sup>114</sup>;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 1.83–1.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.09–2.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.92–3.08 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.17–3.33 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 9.20 (d,  $J$  = 57.1 Hz, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 14.50 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 24.63 (2C), 41.69 (2C) ( $\text{CH}_2$ ), 30.66 (CH), 164.69, 177.63 (C);  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{OS}$  (221.70).

Die Daten der NMR-Spektren stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>114</sup>

(5(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methylammoniumchlorid (65d)

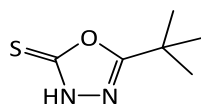


Eine Lösung von [(5(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl]carbamidsäure-*tert*-butylester (**65b**) (475 mg, 2.05 mmol) in einem Gemisch aus Diethylether (10 mL) und Methanol (0.5 mL) wurde nach AAV7 unter Begasung von Chlorwasserstoffgas umgesetzt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 233 mg (1.39 mmol, 68%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 181–184 °C (Zersetz.), Lit.: 184 °C<sup>114</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 4.22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 9.03 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 14.86 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 33.20 (CH<sub>2</sub>), 157.96, 177.83 (C); C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>OS (167.61).

Die Daten der NMR-Spektren stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>114</sup>

5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (65e)



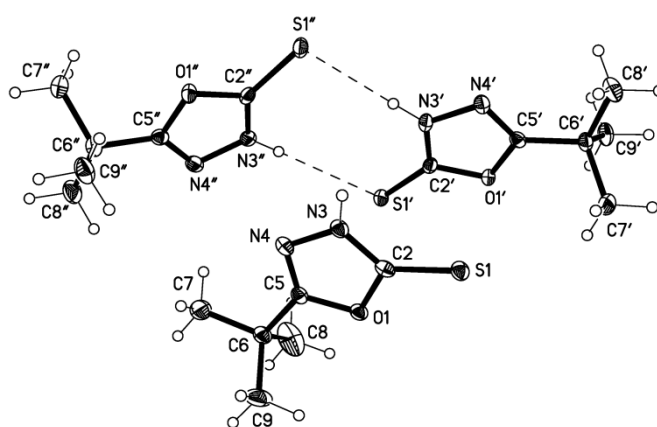
Ein Gemisch aus Trimethylelessigsäuremethylester (4.38 g, 37.5 mmol) und einer Hydrazinhydrat-Lösung (64%) (3.75 g, 75.0 mmol) wurde 20 h unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. Die klare Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Im Rückstand befand sich das Pivalohydrazid (3.66 g, 31.5 mmol), welches nach AAV8 mit Kaliumhydroxid (1.76 g, 31.5 mmol) und Kohlenstoffdisulfid (6.30 mL, 104 mmol) in Ethanol (50 mL) umgesetzt wurde. Es wurde aus Methanol umkristallisiert und das Produkt als hellgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 1.70 g (0.0107 mol, 29%) erhalten.



Schmp.: 83–85 °C, Lit.: 84–85 °C<sup>146</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 11.61 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.35 (3C, CH<sub>3</sub>), 32.74, 171.04, 178.67 (C); C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS (158.22).

Die Daten der NMR-Spektren sind mit jenen der Literatur vergleichbar.<sup>147</sup>

Durch Kristallisation aus Petrolether/Ethylacetat konnten Kristalle erzeugt werden, die in den Laboratorien von Prof. Dr. Peter G. Jones mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht wurden.



**Abbildung 9-2:** Darstellung der Röntgenkristallstruktur von **65e**. Die Nummerierung der Atome entspricht nicht den IUPAC-Regularien.

**Tabelle 9-6:** Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS	
M <sub>r</sub>	158.22	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Monoclinic	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> /c	
Gitterkonstanten	a = 11.5871(5) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 10.4599(4) Å	$\beta = 104.000(4)^\circ$
	c = 20.6633(9) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	2430.00(18) Å <sup>3</sup>	
Z	12	
Dichte (berechnet)	1.297 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorptionskoeffizient	0.335 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1008	
Kristallgröße	0.35 x 0.20 x 0.15 mm <sup>3</sup>	

Θ-Bereich für die Datensammlung	2.20 to 30.03°
Limitierende Indices	-16<=h<=15, -14<=k<=14, -29<=l<=28
Zahl der Reflexe	62473
Unabhängige Reflexe	7031 [R(int) = 0.0550]
Vollständigkeit bis Θ = 30.03°	99.00%
Absorptionskorrektur	<i>Semi-empirical from equivalents</i>
Max. und min. Transmission	1.00000 and 0.97215
Verfeinerungsmethode	<i>Full-matrix least-squares on F<sup>2</sup></i>
Daten/Einschränkungen/Parameter	7031 / 0 / 292
<i>Goodness-of-fit on F<sup>2</sup></i>	1.029
Finale R Indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0370, wR2 = 0.0770
R Indices (alle Daten)	R1 = 0.0514, wR2 = 0.0826
Größte Differenzpeaks	0.562 and -0.290 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabelle 9-7:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$ -Tensors.<sup>a</sup>

	x	y	z	U(eq)
S(1)	4256.4(3)	6273.0(3)	4145.8(2)	16.6(1)
O(1)	5876.4(8)	8103.4(9)	4529.0(5)	15.1(2)
C(2)	5466.6(12)	6912.3(13)	4632.2(7)	14.2(3)
N(3)	6217.9(10)	6481.9(11)	5178.8(6)	15.6(2)
N(4)	7107.7(10)	7356.6(11)	5444.6(6)	16.6(2)
C(5)	6870.7(12)	8305.3(13)	5039.7(7)	14.6(3)
C(6)	7480.1(12)	9577.1(13)	5062.4(7)	18.3(3)
C(7)	8545.8(15)	9615.1(15)	5661.4(9)	32.2(4)
C(8)	7856.7(19)	9789.0(19)	4414.2(10)	44.1(5)
C(9)	6588.1(15)	10615.7(15)	5148.5(10)	34.6(4)
S(1')	7879.9(3)	6122.7(3)	3906.0(2)	15.5(1)
O(1')	6068.3(8)	4663.3(9)	3261.2(4)	13.2(2)
C(2')	6931.7(11)	4913.5(13)	3827.7(6)	13.4(2)
N(3')	6815.0(11)	4000.7(11)	4252.2(6)	17.6(2)
N(4')	5907.9(10)	3144.4(11)	3984.5(6)	18.0(2)
C(5')	5483.7(11)	3580.4(12)	3395.1(6)	13.5(2)
C(6')	4494.6(12)	3059.6(13)	2855.6(6)	15.2(3)
C(7')	3474.4(13)	4033.4(15)	2693.9(8)	24.0(3)
C(8')	4062.3(14)	1801.2(15)	3089.6(7)	23.5(3)
C(9')	4966.8(13)	2836.7(15)	2231.2(7)	20.5(3)
S(1'')	8720.7(3)	3521.4(3)	5674.6(2)	19.4(1)
O(1'')	9747.4(8)	5282.2(9)	6550.3(4)	15.3(2)
C(2'')	9341.4(11)	4930.0(13)	5900.3(6)	14.2(3)
N(3'')	9603.1(10)	5901.7(11)	5548.7(6)	15.9(2)
N(4'')	10185.0(11)	6883.9(11)	5946.8(6)	17.6(2)
C(5'')	10252.5(11)	6473.4(13)	6541.0(7)	14.7(3)

C(6'')	10735.4(12)	7116.0(14)	7197.5(7)	17.4(3)
C(7'')	11651.7(13)	6238.2(15)	7647.8(7)	23.1(3)
C(8'')	11312.1(15)	8383.6(15)	7082.9(8)	27.4(3)
C(9'')	9687.5(14)	7348.8(16)	7516.9(8)	26.4(3)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-8:** Bindungslängen [Å]<sup>a</sup>

S(1)-C(2)	1.6559(14)	C(5')-C(6')	1.4950(18)
O(1)-C(2)	1.3682(16)	C(6')-C(8')	1.528(2)
O(1)-C(5)	1.3775(16)	C(6')-C(7')	1.5348(19)
C(2)-N(3)	1.3269(17)	C(6')-C(9')	1.5362(18)
N(3)-N(4)	1.3883(16)	S(1'')-C(2'')	1.6563(14)
N(4)-C(5)	1.2840(17)	O(1'')-C(2'')	1.3621(15)
C(5)-C(6)	1.5015(19)	O(1'')-C(5'')	1.3787(16)
C(6)-C(8)	1.522(2)	C(2'')-N(3'')	1.3264(18)
C(6)-C(7)	1.523(2)	N(3'')-N(4'')	1.3851(16)
C(6)-C(9)	1.539(2)	N(4'')-C(5'')	1.2852(17)
S(1')-C(2')	1.6574(14)	C(5'')-C(6'')	1.4958(19)
O(1')-C(2')	1.3685(15)	C(6'')-C(8'')	1.529(2)
O(1')-C(5')	1.3816(15)	C(6'')-C(9'')	1.535(2)
C(2')-N(3')	1.3253(18)	C(6'')-C(7'')	1.536(2)
N(3')-N(4')	1.3899(16)	C(5')-C(6')	1.4950(18)
N(4')-C(5')	1.2818(17)	C(6')-C(8')	1.528(2)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-9:** Bindungswinkel [°]<sup>a</sup>

C(2)-O(1)-C(5)	106.12(10)	O(1')-C(5')-C(6')	118.29(11)
N(3)-C(2)-O(1)	105.11(11)	C(5')-C(6')-C(8')	109.19(11)
N(3)-C(2)-S(1)	131.65(11)	C(5')-C(6')-C(7')	109.37(11)
O(1)-C(2)-S(1)	123.23(10)	C(8')-C(6')-C(7')	110.27(12)
C(2)-N(3)-N(4)	112.62(11)	C(5')-C(6')-C(9')	108.48(11)
C(5)-N(4)-N(3)	103.32(11)	C(8')-C(6')-C(9')	110.22(12)
N(4)-C(5)-O(1)	112.83(12)	C(7')-C(6')-C(9')	109.27(12)
N(4)-C(5)-C(6)	129.76(12)	C(2'')-O(1'')-C(5'')	106.10(10)
O(1)-C(5)-C(6)	117.36(11)	N(3'')-C(2'')-O(1'')	105.22(11)
C(5)-C(6)-C(8)	109.53(12)	N(3'')-C(2'')-S(1'')	131.97(11)
C(5)-C(6)-C(7)	109.34(12)	O(1'')-C(2'')-S(1'')	122.76(10)
C(8)-C(6)-C(7)	111.26(14)	C(2'')-N(3'')-N(4'')	112.71(11)
C(5)-C(6)-C(9)	107.77(12)	C(5'')-N(4'')-N(3'')	103.17(11)
C(8)-C(6)-C(9)	110.03(15)	N(4'')-C(5'')-O(1'')	112.79(12)
C(7)-C(6)-C(9)	108.84(13)	N(4'')-C(5'')-C(6'')	129.74(13)
C(2')-O(1')-C(5')	106.14(10)	O(1'')-C(5'')-C(6'')	117.41(11)

N(3')-C(2')-O(1')	104.94(11)	C(5'')-C(6'')-C(8'')	109.32(12)
N(3')-C(2')-S(1')	131.03(10)	C(5'')-C(6'')-C(9'')	107.45(11)
O(1')-C(2')-S(1')	124.03(10)	C(8'')-C(6'')-C(9'')	110.47(13)
C(2')-N(3')-N(4')	112.91(11)	C(5'')-C(6'')-C(7'')	109.45(12)
C(5')-N(4')-N(3')	103.18(11)	C(8'')-C(6'')-C(7'')	110.39(12)
N(4')-C(5')-O(1')	112.83(11)	C(9'')-C(6'')-C(7'')	109.70(12)
N(4')-C(5')-C(6')	128.86(12)	O(1'')-C(5'')-C(6'')	118.29(11)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-10:** Torsionswinkel [°]<sup>a</sup>

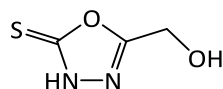
C(5)-O(1)-C(2)-N(3)	-0.29(13)	C(2')-O(1')-C(5')-C(6')	-178.93(11)
C(5)-O(1)-C(2)-S(1)	178.55(9)	N(4')-C(5')-C(6')-C(8')	-3.8(2)
O(1)-C(2)-N(3)-N(4)	0.54(14)	O(1')-C(5')-C(6')-C(8')	174.61(11)
S(1)-C(2)-N(3)-N(4)	-178.16(10)	N(4')-C(5')-C(6')-C(7')	116.95(16)
C(2)-N(3)-N(4)-C(5)	-0.57(15)	O(1')-C(5')-C(6')-C(7')	-64.64(15)
N(3)-N(4)-C(5)-O(1)	0.36(14)	N(4')-C(5')-C(6')-C(9')	-123.94(15)
N(3)-N(4)-C(5)-C(6)	177.74(13)	O(1')-C(5')-C(6')-C(9')	54.46(15)
C(2)-O(1)-C(5)-N(4)	-0.06(15)	C(5'')-O(1'')-C(2'')-N(3'')	-0.71(13)
C(2)-O(1)-C(5)-C(6)	-177.79(11)	C(5'')-O(1'')-C(2'')-S(1'')	177.00(10)
N(4)-C(5)-C(6)-C(8)	124.50(17)	O(1'')-C(2'')-N(3'')-N(4'')	0.75(15)
O(1)-C(5)-C(6)-C(8)	-58.22(17)	S(1'')-C(2'')-N(3'')-N(4'')	-176.66(10)
N(4)-C(5)-C(6)-C(7)	2.3(2)	C(2'')-N(3'')-N(4'')-C(5'')	-0.46(15)
O(1)-C(5)-C(6)-C(7)	179.61(12)	N(3'')-N(4'')-C(5'')-O(1'')	-0.02(14)
N(4)-C(5)-C(6)-C(9)	-115.82(16)	N(3'')-N(4'')-C(5'')-C(6'')	-176.89(13)
O(1)-C(5)-C(6)-C(9)	61.46(16)	C(2'')-O(1'')-C(5'')-N(4'')	0.47(15)
C(5')-O(1')-C(2')-N(3')	-0.15(13)	C(2'')-O(1'')-C(5'')-C(6'')	177.75(11)
C(5')-O(1')-C(2')-S(1')	179.36(9)	N(4'')-C(5'')-C(6'')-C(8'')	-6.3(2)
O(1')-C(2')-N(3')-N(4')	0.51(15)	O(1'')-C(5'')-C(6'')-C(8'')	176.99(12)
S(1')-C(2')-N(3')-N(4')	-178.95(10)	N(4'')-C(5'')-C(6'')-C(9'')	113.65(16)
C(2')-N(3')-N(4')-C(5')	-0.67(15)	O(1'')-C(5'')-C(6'')-C(9'')	-63.09(15)
N(3')-N(4')-C(5')-O(1')	0.56(14)	N(4'')-C(5'')-C(6'')-C(7'')	-127.29(15)
N(3')-N(4')-C(5')-C(6')	179.03(13)	O(1'')-C(5'')-C(6'')-C(7'')	55.97(15)
C(2')-O(1')-C(5')-N(4')	-0.28(14)	C(2'')-O(1'')-C(5'')-C(6'')	-178.93(11)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-11:** Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °]<sup>a</sup>

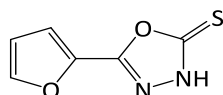
D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(3)-H(03)...S(1) <sup>b</sup>	0.869(19)	2.439(19)	3.3052(12)	174.4(16)
N(3')-H(03')...S(1'')	0.860(19)	2.402(19)	3.2598(12)	175.0(16)
N(3'')-H(03'')...S(1')	0.868(18)	2.682(18)	3.5048(12)	158.7(15)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung. <sup>b</sup> Symmetrietransformation zur Erzeugung äquivalenter Atome: -x+1, -y+1, -z+1

5-Hydroxymethyl-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-thion (65f)

Ein Gemisch aus Ethylglykolat (2.5 g, 0.024 mol) und einer Hydrazinhydrat-Lösung (64%) (6.0 g, 0.12 mol) wurde in Ethanol (10 mL) gelöst und 20 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Toluol aufgenommen und erneut am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Zurück blieb das 2-Hydroxyacetohydrazid als farbloser Feststoff (2.0 g, 0.022 mol). Dieses wurde nach AAV8 zusammen mit Kaliumhydroxid (1.2 g, 0.022 mol) und Kohlenstoffdisulfid (4.4 mL, 0.073 mol) in Ethanol (40 mL) 20 h unter Rückfluss umgesetzt. Abweichend zu AAV8 wurde die angesäuerte wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 1.61 g (12.2 mmol, 51%) als gelbe viskose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Reinigung für nachfolgende Synthesen verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 4.48 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.93 (s, 1H, OH), 14.46 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 53.72 ( $\text{CH}_2$ ), 163.34, 177.97 (C);  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  (132.14).

5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-(3H)-thion (65g)

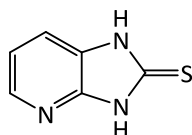
Nach AAV8 wurde eine Lösung aus Furan-2-carbohydrazid (1.0 g, 8.0 mmol), Kaliumhydroxid (0.46 g, 8.1 mmol) und Kohlenstoffdisulfid (1.6 mL, 26 mmol) in Ethanol (25 mL) für 16 h unter Rückfluss umgesetzt. Das Produkt hatte ausreichende Reinheit um

für weitere Synthesen verwendet zu werden. Es wurde mit einer Ausbeute von 1.03 g (6.12 mmol, 77%) als beiger Feststoff erhalten.

Schmp.: 167–170 °C, Lit.: 172–173 °C<sup>148</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.79 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.24–7.40 (m, 1H, ArH), 7.82–8.35 (m, 1H, ArH), 14.80 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 112.62, 115.01, 147.19 (CH), 137.52, 153.51, 176.72 (C); C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (168.17).

Die Daten der NMR-Spektren stimmen mit jenen der Literatur überein.<sup>149</sup>

#### 1*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67a**)

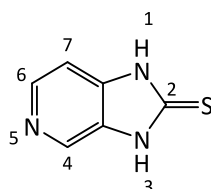


Nach AAV9 wurden 2,3-Diaminopyridin (400 mg, 3.67 mmol), Kaliumhydroxid (206 mg, 3.67 mmol) und Kohlenstoffdisulfid (665  $\mu$ L, 11.0 mmol) in einem Gemisch aus Ethanol (40 mL) und Wasser (4 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als brauner Feststoff in einer Ausbeute von 176 mg (1.16 mmol, 32%) erhalten.

Schmp.: 311–317 °C (Zersetz.), Lit.: 315–316 °C<sup>150</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.13 (dd, *J* = 7.9, 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.47 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H, ArH), 8.10 (dd, *J* = 5.1, 1.4 Hz, 1H, ArH), 12.75 (s, 1H, NH), 13.06 (s, 1H, NH); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S (151.19).

Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmen mit jenen der Literatur überein.<sup>120</sup>

#### 1*H*-Imidazo[4,5-*c*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67b**)



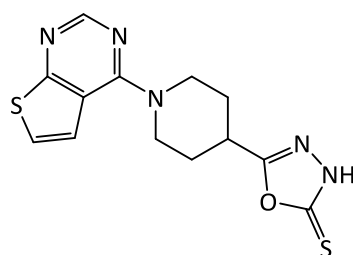
\* Die Nummerierung dient der Zuordnung der NMR-Signale

Nach AAV9 wurden 3,4-Diaminopyridin (232 mg, 2.13 mmol), Kaliumhydroxid (120 mg, 2.13 mmol) und Kohlenstoffdisulfid (385  $\mu$ L, 6.38 mmol) in einem Gemisch aus Ethanol (20 mL) und Wasser (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 310 mg (2.05 mmol, 96%) erhalten.

Schmp.: 361–367 °C (Zersetz.), Lit.: 369–370 °C<sup>150</sup>; <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.17 (dd, *J* = 5.4, 0.9 Hz, 1H, H-6), 8.25 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-7), 8.38 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, H-4), 12.87 (br s, 2H, H-1, H-3); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 105.5, 130.8, 139.3 (CH), 137.1, 144.5, 172.7 (C); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S (151.19).

Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmen mit jenen der Literatur überein.<sup>120</sup>

#### 5-[1-(Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl]-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**71**)

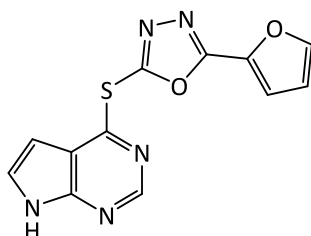


Eine Lösung aus 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (102 mg, 0.601 mmol), 4-(5-Thioxo-4,5-dihydro-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-iumchlorid (**65c**) (133 mg, 0.600 mmol) und Triethylamin (0.17 mL, 1.2 mmol) in DMF (3 mL) wurde 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (Methode: 200 W, 5 min *ramp time*, 30 min Reaktionszeit, 145 psi Maximaldruck) gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur bildete sich ein farbloser Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert und mit THF (10 mL) nachgespült. Zum Filtrat wurde dann Wasser (20 mL) hinzugegeben und mit Ethylacetat (3 x 7 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure angesäuert, wobei ein beiger Feststoff präzipitierte. Dieser wurde abfiltriert und aus einem Gemisch aus Chloroform (40 mL) und Ethanol (6 mL) umkristallisiert. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 71 mg (0.22 mmol, 37%) als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 257–260 °C (Zersetz.); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3432 (br, w, N-H), 2845 (w, -C-H); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.69–1.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.06–2.17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),

3.28 (tt,  $J = 10.7, 4.0$  Hz, 1H, CH), 3.36–3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.30–4.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.39–7.85 (m, 2H, CH (Thiophen)), 8.42 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 14.40 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.81 (2C), 45.50 (2C) (CH<sub>2</sub>), 32.30, 121.41, 122.41, 152.51 (CH), 115.81, 157.87, 165.57, 168.61, 177.66 (C); MS (EI):  $m/z$  (%) = 319.1 [M]<sup>+</sup> (100), 136.0 [M<sup>+</sup>-183] (68) ; HRMS (EI): ber. für C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub> 319.05560, gef. 319.05528; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm;  $t_{M+S} = 3.62$  min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 35:65),  $\lambda_{max}$  [nm] = 263.

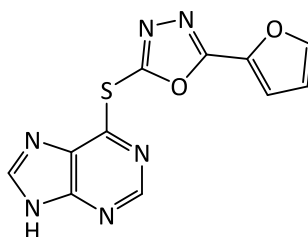
5-(Furan-2-yl)-2-((7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)thio)-1,3,4-oxadiazol (**72a**)



Nach AAV4 wurde eine Lösung von 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65g**) (118 mg, 0.702 mmol), 6-Chlor-7-deazapurin (92 mg, 0.60 mmol) und Triethylamin (97  $\mu$ L, 0.70 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Es folgte eine Umkristallisation aus Ethanol (70%), wobei das Produkt in einer Ausbeute von 112 mg (0.393 mmol, 65%) in Form brauner Kristalle erhalten wurde.

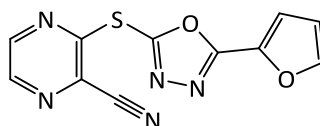
Schmp.: 178–182 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3414 (N-H); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.48 (dd,  $J = 3.6, 1.7$  Hz, 1H, CH (Pyrrol)), 6.84 (dd,  $J = 3.6, 1.8$  Hz, 1H, CH (Furan)), 7.50 (dd,  $J = 3.5, 0.8$  Hz, 1H, CH (Furan)), 7.67 (dd,  $J = 3.6, 2.4$  Hz, 1H, CH (Pyrrol)), 8.12 (dd,  $J = 1.8, 0.7$  Hz, 1H, CH (Furan)), 8.56 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 12.53 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 97.94, 112.88, 115.92, 128.15, 147.71, 150.47 (CH), 115.51, 137.95, 150.32, 153.77, 156.64, 160.20 (C); C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (285.28): ber. C 50.52, H 2.47, N 24.55, gef. C 50.50, H 2.46, N 24.29; MS (EI):  $m/z$  (%) = 285.1 [M]<sup>+</sup> (6) 192.0 [M<sup>+</sup>-93] (100); HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm,  $t_{M+S} = 7.15$  min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50),  $\lambda_{max}$  [nm] = 225, 241, 284; HPLC (Gradient): 98.7%,  $t_{M+S} = 12.16$  min,  $t_M$  (DMSO) = 1.28 min.



6-[(5-Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]purin (**72b**)

Nach AAV4 wurde 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-(3*H*)-thion (**65g**) (168 mg, 0.999 mmol) und 6-Chlorpurin (136 mg, 0.880 mmol) unter Zugabe von Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in DMF (2.5 mL) zunächst für 20 min bei 100 °C und anschließend nochmals 20 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (100 W) umgesetzt. Anschließend wurde der Feststoff aus Ethanol (70%) umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 130 mg (0.454 mmol, 52%) als hellbrauner Farbstoff erhalten

Schmp.: 176–177 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3427 (br, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.85 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H, CH (Furan)), 7.49 (dd, *J* = 3.6, 0.7 Hz, 1H, CH (Furan)), 8.12 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H, CH (Furan)), 8.58 (s, 1H, CH (Purin)), 8.70 (s, 1H, CH (Purin)), 13.82 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 112.94, 115.89, 147.71, 151.72 (CH) 138.11, 145.24, 156.03, 160.19 (C); C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S (286.27): ber. C 46.15, H 2.11, N 29.36, gef. C 46.01, H 2.09, N 29.09; MS (EI): *m/z* (%) = 286.0 [M]<sup>+</sup> (6), 193.0 [M<sup>+</sup>-93] (100); HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 4.43 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 30:70),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 283, 229; HPLC (Gradient): 95.7%, *t*<sub>M+S</sub> = 7.77 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.28 min.

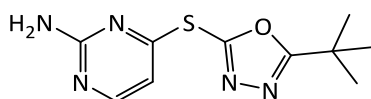
3-[5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio]pyrazin-2-carbonitril (**72c**)

Nach AAV4 wurden 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-(3*H*)-thion (**65g**) (168 mg, 0.999 mmol), 3-Chlorpyrazin-2-carbonitril (123 mg, 0.881 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in DMF (2.5 mL) für 40 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (100 W) gerührt. Es wurde aus Ethanol (70%) umkristallisiert

und das Produkt in einer Ausbeute von 124 mg (0.457 mmol, 52%) als rotbraune Kristalle erhalten.

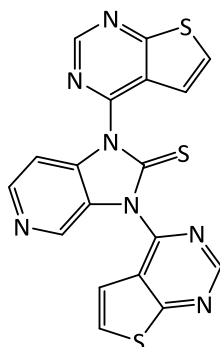
Schmp.: 149–150 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2235 (w, C≡N); <sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.85 (dd, *J* = 3.7, 1.8 Hz, 1H, CH (Furan)), 7.49 (dd, *J* = 3.7, 0.8 Hz, 1H, CH (Furan)), 8.13 (dd, *J* = 1.8, 0.8 Hz, 1H, CH (Furan)), 8.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH (Pyrazin)), 8.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH (Pyrazin)); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 112.98, 116.13, 143.92, 147.88, 148.06 (CH), 114.53, 128.81, 137.80, 154.60, 156.28, 160.18 (C); C<sub>11</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (271.25): ber. C 48.71, H 1.86, N 25.82, gef. C 48.58, H 1.82, N 25.75; MS (EI): *m/z* (%) = 271.0 [M]<sup>+</sup> (34), 95.0 [M<sup>+</sup>-176] (100); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 4.45 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261, 275, 297; HPLC (Gradient): 98.9%, *t*<sub>M+S</sub> = 10.02 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.28 min.

#### 4-[(5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio]pyrimidin-2-amin (**72d**)



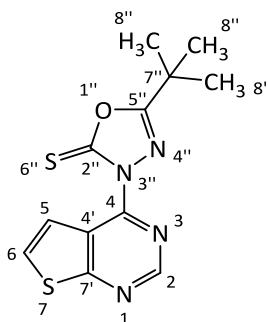
Nach AAV4 wurden 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (111 mg, 0.702 mmol), 2-Amino-4-chlorpyrimidin (78 mg, 0.60 mmol) und Triethylamin (97  $\mu$ L, 0.70 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) gerührt. Es wurde aus Ethanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 30 mg (0.12 mmol, 20%) in Form hellbrauner Kristalle erhalten.

Schmp.: 142–143 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3339 (N-H), 3171 (=C-H), 2974 (-C-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 6.50 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH), 6.90 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.13 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.59 (3C, CH<sub>3</sub>), 106.63, 158.82 (CH), 32.40, 157.11, 162.81, 164.58, 176.34 (C); C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>OS (251.31): ber. C 47.79, H 5.21, N 27.87, gef. C 47.79, H 5.23, N 27.44; MS (EI): *m/z* (%) = 251.1 [M]<sup>+</sup> (12), 168.0 [M<sup>+</sup>-83] (100); HPLC (isokratisch): 99.0% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.42 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 25:75),  $\lambda_{\max}$  [nm] = 230, 303, 384; HPLC (Gradient): 95.6%, *t*<sub>M+S</sub> = 9.34 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.28 min.

1,3-Bis(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-2-thion (**73**)

Eine Lösung von 1*H*-Imidazo[4,5-*c*]pyridin-2(3*H*)-thion (**67b**) (0.091 g, 0.60 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (0.10 g, 0.60 mmol) und Triethylamin (83  $\mu$ L, 0.60 mmol) in DMF (2 mL) wurde wie in AAV4 beschrieben für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (200 W) umgesetzt. Da zu diesem Zeitpunkt dünnschichtchromatographisch nur geringer Produktumsatz nachweisbar war, wurde bei 75 °C für weitere 72 h auf dem Heizbad gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war präzipitierte ein Feststoff, welcher abfiltriert wurde. Der Filterkuchen wurde mit THF (25 mL) gewaschen und dem Filtrat Wasser (100 mL) hinzugefügt. Aus der wässrigen Lösung kristallisierte über Nacht im Kühlschrank ein beiger Feststoff aus, welcher mit dem vorher isolierten identisch war. Das Produkt wurde als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 24 mg (0.057 mol, 9.6%) erhalten.

Schmp.: 220–223 °C;  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 7.22 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.70 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 7.93 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, CH (Pyridin)), 7.96 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.25 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, CH (Thiophen)), 8.70 (dd,  $J$  = 7.0, 1.7 Hz, 1H, CH (Pyridin)), 8.96 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 9.29 (s, 1H, CH (Pyrimidin)), 9.44 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, CH (Pyridin));  $^{13}\text{C-NMR}$ : (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 111.9, 119.2, 120.3, 129.2, 130.1, 131.2, 131.5, 152.6, 152.7 (CH), 123.5, 130.7, 144.3, 154.3, 157.5, 160.2, 167.4, 168.4, 171.4 (C); MS (APCI, ASAP):  $m/z$  (%) = 420.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100), 303.0  $[\text{M}+\text{H}-117]^+$  (20);  $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{N}_7\text{S}_3$  (419.50)

5-tert-Butyl-3-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**74a**)

\*Die Nummerierung der Atome dient der Zuordnung der NMR-Signale und entspricht nicht den Regularien nach IUPAC

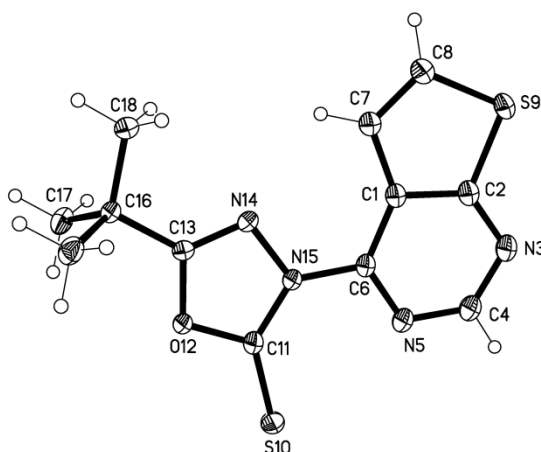
Methode A: Nach AAV3 wurde eine Lösung von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (158 mg, 0.999 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.884 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in Propan-2-ol (5 mL) für 40 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde filtriert und mit Wasser nachgewaschen. Der Filterkuchen wurde aus Methanol/Chloroform (2:1) umkristallisiert und anschließend noch mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (EA/PE 1:4) gereinigt, sodass das Produkt mit einer Ausbeute von 50 mg (0.17 mmol, 19%) als hellgelber Feststoff erhalten wurden

Methode B: Nach AAV3 wurde eine Lösung von 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65e**) (158 mg, 0.999 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.884 mmol) und Triethylamin (0.14 mL, 1.0 mmol) in Butan-1-ol (5 mL) für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem auf RT abgekühlt war bildete sich ein Feststoff, welcher abfiltriert wurde und anschließend aus Aceton umkristallisiert wurde. So wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 70 mg (0.24 mmol, 27%) als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmp.: 174–175 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3077 (=C-H), 2983 (-C-H), 1633; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.49 (s, 9H, H-8''), 7.62–7.72 (m, 2H, H-5, H-6), 9.15 (s, 1H, H-2); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.34 (C-8'') (CH<sub>3</sub>), 120.83, 128.20, 152.68 (C-2) (CH), 32.91 (C-7''), 122.77 (C-4'), 149.56 (C-4), 169.66 (C-5''), 171.82 (C-7'), 175.26 (C-2'') (C); C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub> (292.38): ber. C 49.30, H 4.14, N 19.16, gef. C 49.42, H 3.86, N 19.01; MS (EI): m/z (%) = 292.1 [M]<sup>+</sup> (60), 217.1 [M<sup>+</sup>-75] (100); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, t<sub>M+S</sub> = 5.73 min, t<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser =

50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 237, 323; HPLC (Gradient): 98.7%,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.95 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.28 min.

Zur Erzeugung von Kristallen wurde mit Petrolether (5 mL) versetzt und zum Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurde bis zur vollständigen Lösung Ethylacetat (1 mL) zugetropft. Durch langsames Abkühlen im Heizbad entstanden Kristalle, die durch Röntgenstrukturanalyse durch Prof. Dr. Peter G. Jones untersucht werden konnten:



Limitierende Indices	-10<=h<=10, -7<=k<=8, -14<=l<=14
Zahl der Reflexe	13157
Unabhängige Reflexe	1446 [R(int) = 0.0362]
Vollständigkeit bis $\Theta = 75.00^\circ$	99.70%
Absorptionskorrektur	<i>Semi-empirical from equivalents</i>
Max. und min. Transmission	1.00000 und 0.75539
Verfeinerungsmethode	<i>Full-matrix least-squares on <math>F^2</math></i>
Daten/Einschränkungen/Parameter	1446 / 0 / 114
<i>Goodness-of-fit on <math>F^2</math></i>	1.037
Finale R Indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0256, wR2 = 0.0653
R Indices (alle Daten)	R1 = 0.0274, wR2 = 0.0670
Extinktionskoeffizient	0.0075(9)
Größte Differenzpeaks	0.336 und -0.252 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabelle 9-13:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$ -Tensors.<sup>a</sup>

	x	y	z	U(eq)
C(1)	-246(2)	2500	4563.2(15)	16.3(3)
C(2)	-824(2)	2500	3267.1(15)	18.1(3)
N(3)	117(2)	2500	2562.6(13)	22.0(3)
C(4)	1729(2)	2500	3204.0(16)	22.7(4)
N(5)	2470.6(19)	2500	4425.6(13)	19.7(3)
C(6)	1501(2)	2500	5090.0(15)	15.4(3)
C(7)	-1600(2)	2500	5015.7(16)	18.6(3)
C(8)	-3096(2)	2500	4108.0(16)	20.6(4)
S(9)	-2971.1(5)	2500	2652.6(4)	20.4(1)
S(10)	5668.4(5)	2500	6747.9(4)	27.0(2)
C(11)	3977(2)	2500	7061.3(15)	17.0(3)
O(12)	4006.6(14)	2500	8257.6(10)	16.3(3)
C(13)	2400(2)	2500	8213.9(15)	14.9(3)
N(14)	1343.2(17)	2500	7118.0(13)	16.2(3)
N(15)	2314.8(17)	2500	6374.6(12)	15.7(3)
C(16)	2053(2)	2500	9388.0(14)	15.7(3)
C(17)	2829.5(16)	646.4(19)	10120.9(11)	22.3(3)
C(18)	182(2)	2500	9080.5(16)	23.6(4)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-14:** Bindungslängen [Å]<sup>a</sup>

C(1)-C(6)	1.414(2)	C(8)-S(9)	1.7354(18)
C(1)-C(2)	1.415(2)	S(10)-C(11)	1.6220(17)
C(1)-C(7)	1.439(2)	C(11)-N(15)	1.376(2)
C(2)-N(3)	1.341(2)	C(11)-O(12)	1.3843(19)
C(2)-S(9)	1.7357(18)	O(12)-C(13)	1.368(2)
N(3)-C(4)	1.328(2)	C(13)-N(14)	1.283(2)
C(4)-N(5)	1.341(2)	C(13)-C(16)	1.498(2)
N(5)-C(6)	1.322(2)	N(14)-N(15)	1.3989(19)
C(6)-N(15)	1.413(2)	C(16)-C(18)	1.525(2)
C(7)-C(8)	1.352(2)	C(16)-C(17)	1.5339(15)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

**Tabelle 9-15:** Bindungswinkel [°]<sup>a</sup>

C(6)-C(1)-C(2)	112.83(15)	N(15)-C(11)-S(10)	134.82(13)
C(6)-C(1)-C(7)	135.94(15)	O(12)-C(11)-S(10)	121.61(12)
C(2)-C(1)-C(7)	111.23(15)	C(13)-O(12)-C(11)	107.44(13)
N(3)-C(2)-C(1)	126.15(16)	N(14)-C(13)-O(12)	113.24(14)
N(3)-C(2)-S(9)	122.27(13)	N(14)-C(13)-C(16)	127.54(15)
C(1)-C(2)-S(9)	111.57(13)	O(12)-C(13)-C(16)	119.21(14)
C(4)-N(3)-C(2)	113.20(15)	C(13)-N(14)-N(15)	104.19(13)
N(3)-C(4)-N(5)	127.91(17)	C(11)-N(15)-N(14)	111.55(13)
C(6)-N(5)-C(4)	117.14(16)	C(11)-N(15)-C(6)	130.30(14)
N(5)-C(6)-N(15)	115.95(15)	N(14)-N(15)-C(6)	118.14(14)
N(5)-C(6)-C(1)	122.77(15)	C(13)-C(16)-C(18)	108.50(14)
N(15)-C(6)-C(1)	121.28(15)	C(13)-C(16)-C(17)	108.69(9)
C(8)-C(7)-C(1)	112.83(15)	C(18)-C(16)-C(17)	110.55(9)
C(7)-C(8)-S(9)	113.32(14)	C(13)-C(16)-C(17) <sup>b</sup>	108.69(9)
C(8)-S(9)-C(2)	91.04(8)	C(18)-C(16)-C(17) <sup>b</sup>	110.55(9)
N(15)-C(11)-O(12)	103.57(13)	C(17)-C(16)-C(17) <sup>b</sup>	109.81(14)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung. <sup>b</sup> Symmetrietransformation zur Erzeugung äquivalenter Atome: x,-y+1/2,z

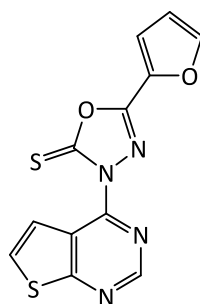
**Tabelle 9-16:** Torsionswinkel [°]<sup>a</sup>

C(6)-C(1)-C(2)-N(3)	0	S(10)-C(11)-O(12)-C(13)	180
C(7)-C(1)-C(2)-N(3)	180	C(11)-O(12)-C(13)-N(14)	0
C(6)-C(1)-C(2)-S(9)	180	C(11)-O(12)-C(13)-C(16)	180
C(7)-C(1)-C(2)-S(9)	0	O(12)-C(13)-N(14)-N(15)	0
C(1)-C(2)-N(3)-C(4)	0	C(16)-C(13)-N(14)-N(15)	180
S(9)-C(2)-N(3)-C(4)	180	O(12)-C(11)-N(15)-N(14)	0
C(2)-N(3)-C(4)-N(5)	0	S(10)-C(11)-N(15)-N(14)	180
N(3)-C(4)-N(5)-C(6)	0	O(12)-C(11)-N(15)-C(6)	180

C(4)-N(5)-C(6)-N(15)	180	S(10)-C(11)-N(15)-C(6)	0
C(4)-N(5)-C(6)-C(1)	0	C(13)-N(14)-N(15)-C(11)	0
C(2)-C(1)-C(6)-N(5)	0	C(13)-N(14)-N(15)-C(6)	180
C(7)-C(1)-C(6)-N(5)	180	N(5)-C(6)-N(15)-C(11)	0
C(2)-C(1)-C(6)-N(15)	180	C(1)-C(6)-N(15)-C(11)	180
C(7)-C(1)-C(6)-N(15)	0	N(5)-C(6)-N(15)-N(14)	180
C(6)-C(1)-C(7)-C(8)	180	C(1)-C(6)-N(15)-N(14)	0
C(2)-C(1)-C(7)-C(8)	0	N(14)-C(13)-C(16)-C(18)	0
C(1)-C(7)-C(8)-S(9)	0	O(12)-C(13)-C(16)-C(18)	180
C(7)-C(8)-S(9)-C(2)	0	N(14)-C(13)-C(16)-C(17)	120.26(10)
N(3)-C(2)-S(9)-C(8)	180	O(12)-C(13)-C(16)-C(17)	-59.74(10)
C(1)-C(2)-S(9)-C(8)	0	N(14)-C(13)-C(16)-C(17) <sup>b</sup>	-120.26(10)
N(15)-C(11)-O(12)-C(13)	0	O(12)-C(13)-C(16)-C(17) <sup>b</sup>	59.74(9)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung. <sup>b</sup> Symmetrietransformation zur Erzeugung äquivalenter Atome: x,-y+1/2,z

#### 5-(Furan-2-yl)-3-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**74b**)



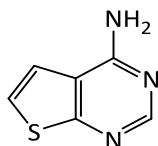
Eine Suspension von 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65g**) (0.092 g, 0.55 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (0.085 g, 0.50 mmol) und Triethylamin (76  $\mu$ L, 0.55 mmol) in Ethanol (2 mL) wurde für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach Abkühlen auf Raumtemperatur auskristallisierte Feststoff wurde durch Filtration isoliert. Dabei handelte es sich um ein Gemisch des gewünschten Produkts **74b** und dem isomeren **44l** im Verhältnis 1:2. Eine Probe (10 mg) des Gemischs wurden zur Vervollständigung der Reaktion in ein Mikrowellengefäß eingewogen und auf dem Ölbad (200 °C) zur Schmelze gebracht. Der Reaktionsfortschritt wurde via HPLC verfolgt. Nach 2.5 h in der Schmelze wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Produkt als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 8 mg (0.03 mmol, 80%) erhalten.

Schmp.: 186 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3123, 3081 (=C-H), 1651, 1615;  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.89 (dd,  $J$  = 3.5, 1.8 Hz, 1H, CH (Furan)), 7.58 (dd,  $J$  = 3.5, 0.9 Hz,



1H, CH (Furan)), 7.81 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, CH(Thiophen)), 8.17 (dd,  $J = 1.8, 0.9$  Hz, 1H, CH (Furan)), 8.19 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, CH (Thiophen)), 9.23 (s, 1H, CH (Pyrimidin));  $^{13}\text{C}$ -NMR: (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 113.0, 116.8, 120.8, 130.3, 148.1, 152.6 (CH), 123.3, 136.9, 149.0, 152.7, 171.3, 173.7 (C);  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  (302.36): ber. C 47.67, H 2.00, N 18.53, gef. C 47.74, H 2.05, N 18.39; MS (APCI, ASAP):  $m/z$  (%) = 303.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100), 243  $[\text{M}+\text{H}-60]^+$  (98); HPLC-Gradient (HPLC-3): 86.7% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}} = 10.84$  min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.15 min,  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 238, 303.

#### 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidin (76)



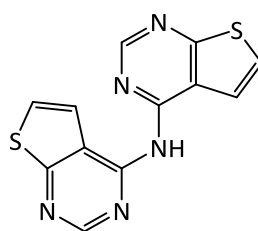
Methode A: Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Lv *et al.*<sup>126</sup> Ein Gemisch aus 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (280 mg, 1.65 mmol) und einer wässrigen Ammoniaklösung (26%, 20 mL) wurde unter Rühren 24 h bei 90 °C erhitzt. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt war bildete sich ein farbloser Feststoff. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser (50 mL) gewaschen und anschließend im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 183 mg (1.21 mmol, 73%) als farbloser Feststoff erhalten.

Methode B: Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von SMITH *et al.*<sup>127</sup> Eine Lösung von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (500 mg, 2.95 mmol) in 1,4-Dioxan (5 mL) wurde mit einer wässrigen Ammoniaklösung (26%, 10 mL) versetzt und für 2 h bei 135 °C unter Mikrowelleneinstrahlung (Methode: 100 W, 5 min *ramp time*, 2 h Reaktionszeit, Maximaldruck 145 psi) gerührt. Der Druck schwankte dabei zwischen 90 und 100 psi. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt war bildete sich ein Feststoff. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser (40 mL) gewaschen und anschließend bei 60 °C im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 315 mg (2.08 mmol, 71%) als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 230–235 °C (Zersetz.), Lit.: 235 °C<sup>151</sup>; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3320 (N-H); 3137 (N-H); <sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.37–7.76 (m, 4H, ArH, NH<sub>2</sub>), 8.27 (s, 1H, CH (Pyrimidin)); <sup>13</sup>C-NMR: (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 119.71, 122.23, 153.92 (CH), 115.57, 158.51, 166.25 (C); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S (151.19): ber. C 47.67, H 3.33, N 27.79, gef. C 47.54, H 3.11, N 27.66.

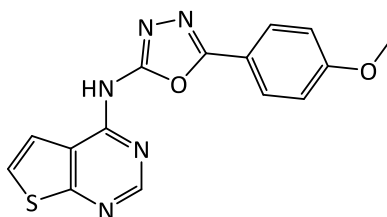
Die Spektraldaten sind vergleichbar mit jenen aus der Literatur.<sup>152</sup>

#### Bis(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)amin (**77**)



Eine Suspension von 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**76**) (100 mg, 0.66 mmol), 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (150 mg, 0.88 mmol) und Natriumhydrid (60%) (132 mg, 3.3 mmol) in DMF (8 mL) wurde 3 h bei 100 °C und 12 h bei 60 °C erhitzt. Das Gemisch wurde dann auf Eis (15 g) geleert und die wässrige Mischung mit Ethylacetat (3 x 10 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit Petrolether versetzt (50 mL), 30 min zum Rückfluss erhitzt und anschließend heiß filtriert. Der Filterkuchen wurde mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (LM: Ethylacetat) gereinigt und das Produkt in einer Ausbeute von 42 mg (0.15 mmol, 22%) als hellbrauner Feststoff erhalten.

Schmp.: 218–219 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3434 (br, w, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.58 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH (Thiophen)), 7.82 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH (Thiophen)), 8.73 (s, 2H, CH (Pyrimidin)), 11.08 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 121.21 (2C), 125.35 (2C), 153.74 (2C) (CH), 120.28 (2C), 152.84 (2C), 168.51 (2C) (C); MS (EI): *m/z* (%) = 285.0 [M]<sup>+</sup> (62), 284.0 [M<sup>+</sup>-H] (100); HRMS (EI): ber. für C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> [M<sup>+</sup>-H] 284.00591, gef. 284.00590; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 96.5% bei 280 nm; *t*<sub>M+S</sub> = 5.42 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 35:65),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 238, 319, 355; HPLC-Gradient: 97.9%, *t*<sub>M+S</sub> = 9.89 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.28 min.

5-(4-Methoxyphenyl)-N-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (79)

Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von GARNIER *et. al.*<sup>128</sup> durchgeführt. Tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0) (23 mg, 0.025 mmol) und Xantphos (29 mg, 0.050 mmol) wurden in einen Zweihalskolben eingewogen. Dieser wurde mit Stickstoff gespült, anschließend getrocknetes 1,4-Dioxan (2 mL) zugegeben und bei RT unter Stickstoffatmosphäre 10 min gerührt. In einem Dreihalskolben wurde eine Lösung aus 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (85 mg, 0.50 mmol), 5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (115 mg, 0.601 mmol) und Kaliumcarbonat (1.4 g, 10 mmol) in getrocknetem 1,4-Dioxan (6 mL) hergestellt. Der Dreihalskolben wurde mit Stickstoff gespült und anschließend die Tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0)/Xantphos-Suspension zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter ständigem Stickstoffstrom und kräftigem Rühren 5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde über Kieselgel filtriert und mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (4:1, 40 mL) gespült. Das erhaltene Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat (40 mL) für 1 h zum Rückfluss erhitzt und heiß filtriert. Nach erneutem Eindampfen des Filtrats unter vermindertem Druck wurde aus Ethanol umkristallisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 24 mg (0.074 mmol, 15%) in Form beiger Kristalle erhalten.

Schmp.: 268–270 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3430 (w, br, N-H); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.11–7.17 (m, 2H, ArH), 7.67 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, ArH), 7.83 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, ArH), 7.90–7.97 (m, 2H, ArH), 8.57 (s, 1H, ArH), 13.12 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 55.48 (CH<sub>3</sub>), 114.83, 126.30, 127.75 (CH), 116.26, 121.10, 161.61 (C), im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum liegen zu wenige Signale vor; MS (EI): *m/z* (%): 325.0 [M]<sup>+</sup> (100), 178.0 [M<sup>+</sup>-147] (53); HPLC: 96.4% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm; *t*<sub>M+S</sub> = 5.01 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer<sub>pH 2.7</sub> = 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 286, 334; HPLC-Gradient: 97.6%, *t*<sub>M+S</sub> = 11.91 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.28 min.

### 9.2.3 Untersuchung des Reaktionsverlaufs einiger Synthesen mit Hilfe der HPLC

Es wurden in verschiedenen zeitlichen Abständen Aliquote (20 µl) der Reaktionsansätze mit einer Pipette entnommen, mit DMSO (1 mL) verdünnt und mittels Gradientenelution an der HPLC-2 vermessen. Die Chromatogramme wurden mit der 100%-Methode ausgewertet und somit die Anteile der einzelnen Reaktionsbestandteile ermittelt.

Es wurden die Reaktionen von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (**68a**) (1.0 Äquivalent) mit 5-*tert*-Butyl-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (1.1 Äquivalente) und Triethylamin (1.1 Äquivalente) in einem Lösungsmittel (2 mL) bei unterschiedlichen Temperaturen während definierter Beobachtungszeiträume untersucht. Die genauen Einwaagen und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9-17 zusammengefasst.

**Tabelle 9-17:** Reaktionsbedingungen und Einwaagen der Reaktionsansätze zur Untersuchung der Reaktion zwischen **65e** und **68a**.

Ansatz	m ( <b>65e</b> ) [mg]	m ( <b>68a</b> ) [mg]	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Beobachtungs- zeit [h]
1a	88	87	Ethanol	78	47
1b	88	87	Ethanol	78	22
2a	88	85	Butan-1-ol	118	3
2b	88	86	Butan-1-ol	118	46
3	87	84	Ethanol	20	192
4	122	119	Ethanol	68	5
5	67	63	Toluen	111	7
6	66	63	DMF	120	28

Außerdem wurde die Reaktion von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (85 mg, 0.50 mmol) mit 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-thion (**65g**) (93 mg, 0.55 mmol) und Triethylamin (76 µL, 0.55 mmol) in Ethanol (2 mL) unter Rückfluss für 48 h beobachtet.

Des Weiteren wurden die Reaktion von 4-Chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin (68 mg, 0.40 mmol) mit 4-(5(4*H*)-Thioxo-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-1-carbonsäure-*tert*-

butylester (**65a**) (126 mg, 0.442 mmol) und Triethylamin (61  $\mu$ L, 0.44 mmol) in Ethanol (2 mL) unter Rückfluss für 48 h beobachtet.

Die Umwandlung der kinetisch kontrollierten Produkte **44l** und **44p** in die korrespondierenden thermodynamisch kontrollierten Produkte **74b** und **74a** wurde in der Schmelze durchgeführt: Der entsprechende Diarylthioether (10 mg) wurde in ein Mikrowellengefäß eingewogen und auf dem Ölbad bei 160-200 °C bis zur Schmelze erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe der HPLC-3 kontrolliert. In verschiedenen zeitlichen Abständen wurden Proben entnommen, die in DMSO (0.5 mL) gelöst und mittels Gradientelution überprüft wurden. Die UV-Absorptionsmaxima der einzelnen Isomere, die mit Hilfe des DAD bestimmt wurden, dienten neben den Retentionszeiten zur Identifizierung. Die Chromatogramme wurden mit der 100%-Methode ausgewertet und somit die Anteile der einzelnen Reaktionsbestandteile ermittelt.

### 9.3 Löslichkeitsuntersuchung

Die thermodynamische Löslichkeit einiger Testsubstanzen wurde mit der etablierten *shake flask*-Methode mit anschließender Vermessung mittels HPLC-UV ermittelt.<sup>138, 153</sup>

#### 9.3.1 Kalibrierung

Je zwei Proben pro untersuchte Substanz wurden exakt eingewogen (Massenbereich: 253–346  $\mu$ g) und durch die Zugabe von DMSO zwei Stammlösungen mit 10 mM Konzentration je Substanz hergestellt (Ausnahme: für **44z** wurden je zwei 1 mM Stammlösungen hergestellt). Durch Verdünnung jeder dieser Stammlösungen mit Acetonitril wurden je drei Kalibrierlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (Konzentrationsbereich: **44l**: 100  $\mu$ M – 1  $\mu$ M; **44v**: 2 mM – 100  $\mu$ M; **44w**: 100  $\mu$ M – 10  $\mu$ M; **44x**: 1.8 mM – 100  $\mu$ M; **44y**: 100  $\mu$ M – 2  $\mu$ M; **44z**: 10  $\mu$ M – 0.3  $\mu$ M; **44ad**: 100  $\mu$ M – 10  $\mu$ M). Die Kalibrierlösungen wurden mittels isokratischer HPLC (Injektionsvolumen: siehe Tabelle 9-18, Elutionsmittel: siehe Tabelle 9-18, Flussrate: 1.000 mL/min, Säulentemperatur: 40 °C, Gesamtlaufzeit: 8 min, Detektion: DAD im für die Substanz spezifischen Maximum) vermessen. Die Flächen der Substanzsignale (% AUC) wurden ermittelt und gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Von

jeder Testsubstanz wurden somit zwei unabhängige Verdünnungsreihen erstellt, bei welchen die jeweiligen Kalibrierlösungen in Duplikaten vermessen wurden. Mit Microsoft Excel (2010, Microsoft Corporation) wurden aus den ermittelten Daten Kalibriergeraden erstellt.

**Tabelle 9-18:** Fließmittelzusammensetzungen und Injektionsvolumina bei den HPLC-Messungen zur Bestimmung der Löslichkeitseigenschaften.

ID	Fließmittelzusammensetzung	Injektionsvolumen [ $\mu\text{L}$ ]
<b>44l</b>	ACN/Wasser (55:45)	10
<b>44v</b>	ACN/Puffer <sub>pH 7.4</sub> (25:75)	7
<b>44w</b>	ACN/Wasser (50:50)	10
<b>44x</b>	ACN/Wasser (45:55)	10
<b>44y</b>	ACN/Wasser (35:65)	10
<b>44z</b>	ACN/Puffer <sub>pH 7.4</sub> (45:55)	20
<b>44ad</b>	ACN/Wasser (40:60)	10

### 9.3.2 Vorbereitung und Vermessung der Substanzproben

Etwa 0.5 mg (bei **44v** ca. 1 mg) der Testverbindung wurden in Whatman-Uni-Prep®-Vials gefüllt und 300  $\mu\text{L}$  Phosphatpufferlösung (pH 7.4, Zusammensetzung: siehe Tabelle 9-19) hinzugefügt. Es musste gewährleistet sein, dass ein Bodensatz vorhanden war. Das Vial wurde mit dem zugehörigen Filter so verschlossen, dass der Filter die Lösung nicht berührte. Um der Verdunstung entgegenzuwirken, wurde das Vial zusätzlich mit Verschlussfolie (Parafilm M, Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA) umwickelt. Die Proben wurden für 24–72 h auf einem Schüttelapparat (IKA® KS 3000 ic control, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Die Probenmessung erfolgte nach 24, 48 und 72 h. Dabei wurde überprüft, ob sich schon nach 24 h (Vergleich der Messungen nach 24 h und nach 48 h) oder erst nach 48 h (Vergleich der Messungen nach 48 h und nach 72 h) ein Gleichgewicht einstellte. Zur Vermessung wurden die Proben mit den Durchdrückfiltern filtriert und aus dem Überstand Aliquote entsprechend den Angaben in Tabelle 9-18 mittels HPLC vermessen. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Die HPLC-Methode war bei jeder Probe identisch mit der der

jeweiligen Kalibrierlösungen. Durch Integration der Fläche des Substanzsignals im Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung und mit Hilfe der entsprechenden Kalibriergeraden konnte die Konzentration bestimmt werden.

**Tabelle 9-19:** Zusammensetzung des Phosphatpuffers mit pH 7.4. Modifiziert nach Ph. Eur.<sup>154</sup>

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	290 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mg
NaCl	808 mg
H <sub>2</sub> O (bidest.)	<i>ad</i> 100 mL
3 M Salzsäurelösung	<i>qs</i> <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Die Einstellung des pH-Werts auf pH 7.4 erfolgte unter Verwendung eines pH-Meters mit Glaselektrode

## 9.4 Biologische Testung

### 9.4.1 In vitro-Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität gegenüber *Pf*NF54-Luc

Diese Untersuchungen wurden von ABED NASEREDDIN in den Laboratorien von RON DZIKOWSKI an der *Hebrew University* in Jerusalem durchgeführt.

Kulturen transgener *P. falciparum*-Parasiten der Linie NF54-Luc (*Pf*NF54-Luc) im erythrozytären Stadium wurden für die Untersuchung der antiplasmodialen Aktivität der Testsubstanzen verwendet. Die Parasiten wurden wie vorher beschrieben kultiviert.<sup>155</sup> Diese Parasitenlinie exprimiert konstitutiv Luciferase. Die Untersuchungen wurden in Triplikaten durchgeführt, weshalb die Kulturen in dreifacher Ausführung in transparenten 96-*well*-Platten mit flachem Boden (NUNC, Dänemark) vorgelegt wurden. Die Kavitäten enthielten jeweils 250  $\mu$ L Medium mit einer Parasitämie von 0.5–1.0%. Die Kulturen wurden dann in Gegenwart der Testverbindungen für 48 h (37 °C, 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) in RPMI-1640-Medium inkubiert. Einige Testverbindungen wurden dabei zunächst bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M (nur die Diarylthioether **44a–m**) und bei gutem Ergebnis (> 50% Inhibition) erneut bei 3  $\mu$ M Endkonzentration (**44a**, **44d–m**) untersucht. Alle weiteren Testverbindungen wurden direkt bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M geprüft. Nach der Inkubationszeit wurde jedem *well* ein Volumen von 100  $\mu$ L entnommen und dafür 100  $\mu$ L Bright-Glo®-Substratlösung hinzugefügt. Ein Produkt der ablaufenden Reaktion ist Licht, welches mit Hilfe eines FLUOROSKAN FL Luminometers (Thermo) vermessen wurde, wodurch die Menge lebender Parasitenzellen detektiert werden konnte. Für **43a–t** wurde der Assay mit einer Inkubationszeit von 96 h wiederholt. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte Plasmodien-Kulturen (keine Inhibitorzugabe) verwendet. Diese dienten auch als Referenz zur Berechnung der Hemmungsrate (0% Inhibition des Parasitenwachstums). Die Inhibitionswerte wurden, wenn möglich, mit  $\pm$  SEM (Standardfehlers des Mittelwerts) angegeben. Das Antibiotikum Blastocidin S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), welches auch bei der Selektion von transfizierten Parasiten Verwendung findet, wurde auf jeder 96-*well*-Platte in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/mL als Positivkontrolle verwendet (stets > 95% Inhibition des Parasitenwachstums). Wurde das Plasmodienwachstum bei einer



Testkonzentration von 3  $\mu\text{L}$  um mehr als 50% inhibiert, wurden mit der entsprechenden Testverbindung Dosis-Wirkungskurven erstellt, um den  $\text{IC}_{50}$ -Wert zu bestimmen. Dieser ist definiert als die Konzentration, bei der das Wachstum der Parasiten halbmaximal gehemmt wird.

#### 9.4.2 Coenzym-A-Substitutions-Assay

Diese Untersuchungen wurden von LEONARDO LUCANTONI in den Laboratorien von VICKY AVERY an der *Griffith University* in Nathan, Australien durchgeführt.

Parasiten des *P. falciparum*-Stamms 3D7 im erythrozytären Stadium wurden in RPMI 1640-Medium, das mit 25 mM HEPES, 5% humanem Serum, das von einer männlichen Person mit Blutgruppe AB stammte, 2.5 mg/mL Albumax II sowie 0.37 mM Hypoxanthin versetzt war, kultiviert. Bevor die Parasiten für die biologische Untersuchung eingesetzt wurden, wurden sie mit Hilfe von Sorbitol zweimal synchronisiert, sodass ausschließlich Plasmodien, die sich im Ringstadium befanden, verwendet wurden. In 384-well-Mikroplatten (geeignet zur Bilderfassung) wurden die Parasiten einerseits nur in Gegenwart der Testsubstanzen und andererseits in Gegenwart der Testsubstanzen und Coenzym A (in einer Konzentration von 0.8 mM) evaluiert.<sup>90</sup> Als Referenzsubstanzen wurden Artemisinin, Chloroquin, Puromycin, Pantothenol und Amb180780 verwendet. Puromycin, angewendet in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , wurde als Positivkontrolle verwendet, unbehandelte Parasiten dienten als Negativkontrolle. Chloroquin, Pantothenol und CoA wurden in Wasser gelöst, alle weiteren Probensubstanzen in DMSO (0.4% Endkonzentration von DMSO). Es wurden Verdünnungen von allen Probensubstanzen hergestellt, um Dosis-Wirkungskurven zu erstellen, für die jeweils 14 Messpunkte erzeugt wurden (Konzentrationsbereich von 40  $\mu\text{M}$  bis 0.5 nM für die Testverbindungen und Puromycin; 10 mM – 500 nM für Pantothenol; 10  $\mu\text{M}$  – 0.5 nM für Artemisinin und 4  $\mu\text{M}$  to 0.2 nM für Chloroquin). Alle Proben enthielten insgesamt die gleiche Menge Lösungsmittel. Die Platten wurden für 72 h inkubiert (90%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ ). Danach wurden die Parasiten mit 2-(4-Amidinophenyl)-1H-indol-6-carboxamidin (DAPI) gefärbt und unter Verwendung eines Opera QEHS Konfokal-Bildgebungssystems für Mikroplatten (PerkinElmer) detektiert. Die erhaltenen Daten

wurden wie an anderer Stelle beschrieben<sup>156</sup> analysiert, wodurch die normalisierte prozentuale Inhibition erhalten wurde. Die %-Inhibitionswerte wurden verwendet, um den  $IC_{50}$ -Wert zu bestimmen. Die Inhibitionswerte wurden wenn möglich mit  $\pm$  SEM angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism (GraphPad). Die Untersuchung wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt, deren jeweilige Messpunkte in Duplikaten erzeugt wurden.

Bei allen Messungen war  $Z' \gg 0.5$ , wodurch die Qualität der Assays bestätigt werden konnte.<sup>157</sup>

**Tabelle 9-20:**  $Z'$ -Werte der einzelnen Messreihen des CoA-Substitutions-Assays.

	$Z'$ (Messpunkt 1)	$Z'$ (Messpunkt 2)	Mittelwert $Z'$	SEM $Z'$
ohne CoA (A)	0.75	0.82	0.78	0.03
ohne CoA (B)	0.84	0.74	0.79	0.05
mit CoA (A)	0.76	0.78	0.77	0.01
mit CoA (B)	0.77	0.78	0.77	0.00

#### 9.4.3 Zytotoxizitäts-Assays

Diese Untersuchungen wurden von ABED NASEREDDIN in den Laboratorien von RON DZIKOWSKI an der *Hebrew University* in Jerusalem durchgeführt.

##### THP-1-Zelllinie

Die verwendeten THP-1-Zellen stammen aus einer monozytischen Zelllinie eines Patienten, der unter akuter monozytärer Leukämie litt. Die Kultivierung der THP-1-Zellen erfolgte in feuchter Atmosphäre bei 37 °C in einem  $CO_2$ -Inkubator in RPMI 1640-Medium, welches mit 10% (v/v) fetalem Rinderserum, 2 mM Glutamin, 100 IE/mL Penicillin und 100  $\mu$ g/mL Streptomycin (um mikrobielle Kontamination der Kulturen zu verhindern) versetzt wurde. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Testsubstanzen in DMSO hergestellt, wobei die Konzentrationen zwischen 0.1 und 200  $\mu$ M lagen, und in Triplikaten in Kavitäten einer Multiwell-Zellkulturplatte pipettiert. THP-1-Zellen wurden zu den Testverbindungen gegeben und die Proben für 48 h bei 37 °C und 5%  $CO_2$ -Anteil

inkubiert. Danach wurden 20  $\mu\text{L}$  des Indikators AlamarBlue® hinzugegeben. Unbehandelte THP-1-Zellen, die für 70 h bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$ -Anteil kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. Diese wurden mit 10  $\mu\text{L}$  AlamarBlue® versetzt. Um die Viabilität der Zellen zu bestimmen, wurde nach weiteren 4 h Inkubationszeit die Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 544 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ) der Proben mit einem Microplate Reader (Fluoroskan Ascent FL, Finnland) detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism 4 (GraphPad).

### NIH 3T3-Zellen

Mausfibroblasten der Linie NIH 3T3 wurden in DMEM-Fertigmedium kultiviert. Diesem wurde Glutamin, Penicillin und Streptomycin, um mikrobielle Verunreinigungen zu verhindern, sowie 10% (v/v) fetales Kälberserum (FKS) zugegeben. 20 mL der Zellsuspension im DMEM-Medium wurden in 75 mL-Gefäße überführt. Die Zellen sollten nicht bis zur Konfluenz wachsen (maximal 80% Zellen). Nach der Entfernung des Mediums wurden 3 mL Trypsin-EDTA hinzugefügt, woraufhin das Gefäß 1–2 Minuten leicht geschüttelt wurde, um haftende Zellen vom Gefäß zu lösen, was unter Verwendung eines inversen Mikroskops überprüft wurde. 10 mL DMEM-Medium mit 10% (v/v) FKS wurde hinzugegeben und Zellklumpen durch vorsichtiges Aufziehen mit der Pipette entfernt. Nach Auszählung der Zellen wurde die Zellsuspension mit DMEM-Kulturmedium, das mit den gleichen Zusätzen wie zu Beginn versetzt war, verdünnt. Je 125  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension (mit ca.  $2 \times 10^5$  Zellen / mL) wurde in dreifacher Anzahl in die Kavitäten einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zu den Zellsuspensionen wurden die Testverbindungen, die ebenfalls im DMEM-Kulturmedium (mit Glutamin, Penicillin, Streptomycin, 10% (v/v) FKS) suspendiert wurden, hinzugegeben (125  $\mu\text{L}$ /Kavität, ebenso als Triplikate). Zur Ermittlung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes wurden acht 1:3-Verdünnungsserien der Testverbindungen hergestellt. Nachdem die Proben für 48 Stunden inkubiert wurden (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ), wurde 25  $\mu\text{L}$  AlamarBlue® hinzugegeben. Es wurde weitere 3–5 Stunden inkubiert und anschließend mit Hilfe eines FLUOROSKAN FL Luminometers (Thermo) Fluoreszenz gemessen. Als Negativkontrolle und zur Bestimmung der Inhibitionsrate wurden unbehandelte Zellen verwendet (0% Inhibition der Zellproliferation).

**Tabelle 9-21:** Antiplasmodiale Aktivität der 2-Phenoxyanilide gegenüber *Pf*NF54-Luc.

ID	% Inhibition nach 48 h bei	% Inhibition nach 96 h bei
	3 $\mu$ M	3 $\mu$ M
<b>43a</b>	-3.6 $\pm$ 4.5	3.4 $\pm$ 5.8
<b>43b</b>	7.4 $\pm$ 5.0	0.6 $\pm$ 5.4
<b>43c</b>	10.6 $\pm$ 4.0	11.9 $\pm$ 7.0
<b>43d</b>	2.0 $\pm$ 2.5	-2.9 $\pm$ 7.5
<b>43e</b>	22.2 $\pm$ 1.8	6.8 $\pm$ 12.4
<b>43f</b>	1.4 $\pm$ 2.1	3.4 $\pm$ 1.3
<b>43g</b>	6.7 $\pm$ 2.6	-1.2 $\pm$ 5.5
<b>43h</b>	9.2 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 8.5
<b>43i</b>	5.8 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 1.7
<b>43j</b>	-1.6 $\pm$ 2.7	2.8 $\pm$ 10.9
<b>43k</b>	13.2 $\pm$ 1.7	5.7 $\pm$ 5.3
<b>43l</b>	6.8 $\pm$ 4.1	-7.6 $\pm$ 3.6
<b>43m</b>	18.0 $\pm$ 4.3	9.9 $\pm$ 10.4
<b>43n</b>	9.3 $\pm$ 3.0	0.8 $\pm$ 8.9
<b>43o</b>	18.3 $\pm$ 5.8	-0.6 $\pm$ 4.9
<b>43p</b>	10.3 $\pm$ 2.9	31.4 $\pm$ 8.6
<b>43q</b>	10.9 $\pm$ 3.9	-1.6 $\pm$ 9.2
<b>43r</b>	4.7 $\pm$ 1.4	1.4 $\pm$ 11.7
<b>43s</b>	0.3 $\pm$ 5.6	7.2 $\pm$ 12.7
<b>43t</b>	-4.4 $\pm$ 4.9	-16.9 $\pm$ 1.3

**Tabelle 9-22:** Antiplasmodiale Aktivität von **71**, **72a–d**, **74a** und **77**.

ID	% Inhibition, <i>Pf</i> NF54-Luc bei 3 $\mu$ M
<b>71</b>	4.7 $\pm$ 3.3
<b>72a</b>	-24.8 $\pm$ 13.6
<b>72b</b>	1.79 $\pm$ 2.53
<b>72c</b>	0.98 $\pm$ 1.52
<b>72d</b>	-23.4 $\pm$ 6.8
<b>74a</b>	-19.1 $\pm$ 7.0
<b>77</b>	-4.5 $\pm$ 7.9

**Tabelle 9-23:** Antiplasmodiale Aktivität, Effekt der CoA-Zugabe auf die antiplasmodiale Aktivität und Toxizität gegenüber THP-1 und 3T3-Zellen der Diarylthioether **44**.

ID	% Inhibition, <i>Pf</i> NF54-Luc bei 30 $\mu$ M	% Inhibition, <i>Pf</i> NF54-Luc bei 3 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> NF54- Luc	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> 3D7	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> 3D7 + 0.8 mM CoA	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], THP-1	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], 3T3
<b>44a</b>	96.8 $\pm$ 0.9	24.3 $\pm$ 3.2	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44b</b>	25.7 $\pm$ 2.0	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44c</b>	37.3 $\pm$ 3.7	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44d</b>	98.2 $\pm$ 0.6	-0.6 $\pm$ 5.4	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44e</b>	86.9 $\pm$ 1.0	-7.3 $\pm$ 6.9	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44f</b>	96.2 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 4.3	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44g</b>	99.3 $\pm$ 0.0	-13.1 $\pm$ 9.1	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44h</b>	97.0 $\pm$ 0.1	-103.3 $\pm$ 4.4	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44i</b>	82.8 $\pm$ 2.6	-5.5 $\pm$ 3.8	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44j</b>	96.5 $\pm$ 0.0	-11.0 $\pm$ 6.7	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44k</b>	92.6 $\pm$ 0.7	-7.0 $\pm$ 1.8	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44l</b>	98.7 $\pm$ 0.5	80.8 $\pm$ 0.5	0.736	0.283 $\pm$ 0.073	4.61 $\pm$ 0.15	6.13	nb
<b>44m</b>	91.2 $\pm$ 1.7	-8.3 $\pm$ 4.1	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44n</b>	nb	-0.82 $\pm$ 3.11	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44o</b>	nb	2.28 $\pm$ 3.31	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44p</b>	nb	-14.6 $\pm$ 12.9	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44q</b>	nb	-12.3 $\pm$ 2.2	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44r</b>	nb	7.7 $\pm$ 1.8	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44s</b>	nb	-2.8 $\pm$ 16.6	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44t</b>	nb	33.2 $\pm$ 6.8	nb	10.5 $\pm$ 1.1	16.1 $\pm$ 2.2	nb	nb
<b>44u</b>	nb	4.7 $\pm$ 2.6	nb	5.37 $\pm$ 1.0	39.7 $\pm$ 0.7	nb	nb
<b>44v</b>	nb	96.5 $\pm$ 1.6	0.675	1.26 $\pm$ 0.16	2.31 $\pm$ 0.17	> 300	212
<b>44w</b>	nb	99.9 $\pm$ 0.0	0.434	0.0388 $\pm$ 0.0010	2.61 $\pm$ 0.42	27.5	nb
<b>44x</b>	nb	99.5 $\pm$ 0.5	0.382	0.0747 $\pm$ 0.021	2.58 $\pm$ 0.42	33.6	nb
<b>44y</b>	nb	99.7 $\pm$ 0.1	1.07	0.0958 $\pm$ 0.0063	11.2 $\pm$ 2.6	11	nb

ID	% Inhibition, <i>Pf</i> NF54-Luc bei 30 $\mu$ M	% Inhibition, <i>Pf</i> NF54-Luc bei 3 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> NF54- Luc	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> 3D7	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], <i>Pf</i> 3D7 + 0.8 mM CoA	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], THP-1	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], 3T3
<b>44z</b>	nb	95.0 $\pm$ 1.1	0.190	0.0734 $\pm$ 0.0022	0.531 $\pm$ 0.007	16.5	> 300
<b>44aa</b>	nb	-1.9 $\pm$ 5.3	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44ab</b>	nb	-18.4 $\pm$ 10.6	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44ac</b>	nb	-36.3 $\pm$ 10.6	nb	nb	nb	nb	nb
<b>44ad</b>	nb	98.0 $\pm$ 0.2	0.305	0.149 $\pm$ 0.021	1.06 $\pm$ 0.03	28	nb

## 10 Literaturverzeichnis

- 1 Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.,  
*Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 9. Aufl., **2008**. Wissenschaftliche  
Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 892-900.
- 2 World Health Organization, WHO: World Malaria Report 2015  
([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1)), abgerufen am 15.04.2016.
- 3 World Health Organization, WHO: World Malaria Report 2014  
([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf?ua=1)), abgerufen am 26.01.2015.
- 4 Sachs, J.; Malaney, P., The economic and social burden of malaria. *Nature* **2002**,  
415, 680–685.
- 5 Wirth, D. F., The parasite genome: Biological revelations. *Nature* **2002**, 419,  
495–496.
- 6 Robert Koch Institut, Malaria - RKI-Ratgeber für Ärzte  
([http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Malaria.html#doc2392924bodyText2](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html#doc2392924bodyText2)), abgerufen am 03.05.2016.
- 7 Hovlid, M. L.; Winzeler, E. A., Phenotypic screens in antimalarial drug discovery.  
*Trends Parasitol.* **2016**, 32, 697–707.
- 8 The malERA Consultative Group on Drugs, A research agenda for malaria  
eradication: Drugs. *PLoS Med.* **2011**, 8, e1000402.
- 9 World Health Organization, Core vector control methods  
([http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/core\\_methods/en/](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/en/)),  
abgerufen am 03.05.2016.
- 10 Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.,  
*Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 9. Aufl., **2008**. Wissenschaftliche  
Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1052.

- 11 Godfray, H. C. J., Mosquito ecology and control of malaria. *J. Anim. Ecol.* **2013**, 82, 15–25.
- 12 Gantz, V. M.; Bier, E., The dawn of active genetics. *BioEssays* **2016**, 38, 50–63.
- 13 Gantz, V. M.; Jasinskiene, N.; Tatarenkova, O.; Fazekas, A.; Macias, V. M.; Bier, E.; James, A. A., Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112, E6736–6743.
- 14 Hammond, A.; Galizi, R.; Kyrou, K.; Simoni, A.; Siniscalchi, C.; Katsanos, D.; Gribble, M.; Baker, D.; Marois, E.; Russell, S.; Burt, A.; Windbichler, N.; Crisanti, A.; Nolan, T., A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotech.* **2016**, 34, 78–83.
- 15 First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA  
([http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2015/07/news\\_detail\\_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1)), abgerufen am 04.05.2016.
- 16 Neafsey, D. E.; Juraska, M.; Bedford, T.; Benkeser, D.; Valim, C.; Griggs, A.; Lievens, M.; Abdulla, S.; Adjei, S.; Agbenyega, T.; Agnandji, S. T.; Aide, P.; Anderson, S.; Ansong, D.; Aponte, J. J.; Asante, K. P.; Bejon, P.; Birkett, A. J.; Bruls, M.; Connolly, K. M.; D'Alessandro, U.; Dobaño, C.; Gesase, S.; Greenwood, B.; Grimsby, J.; Tinto, H.; Hamel, M. J.; Hoffman, I.; Kamthunzi, P.; Kariuki, S.; Kremsner, P. G.; Leach, A.; Lell, B.; Lennon, N. J.; Lusingu, J.; Marsh, K.; Martinson, F.; Molel, J. T.; Moss, E. L.; Njuguna, P.; Ockenhouse, C. F.; Ogutu, B. R.; Otieno, W.; Otieno, L.; Otieno, K.; Owusu-Agyei, S.; Park, D. J.; Pellé, K.; Robbins, D.; Russ, C.; Ryan, E. M.; Sacarlal, J.; Sogoloff, B.; Sorgho, H.; Tanner, M.; Theander, T.; Valea, I.; Volkman, S. K.; Yu, Q.; Lapierre, D.; Birren, B. W.; Gilbert, P. B.; Wirth, D. F., Genetic diversity and protective efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 373, 2025–2037.
- 17 The RTS,S Clinical Trials Partnership, Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: A phase 3 randomized,



- controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med.* **2014**, *11*, e1001685.
- 18 World Health Organization, Malaria vaccine: WHO position paper – January 2016 (<http://www.who.int/wer/2016/wer9104.pdf?ua=1>), abgerufen am 04.05.2016.
  - 19 Tu, Y., The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1217–1220.
  - 20 Collaboration Research Group for Qinghaosu, A new sesquiterpene lactone - qinghaosu [in chinesis]. *Kexue Tongbao* **1977**, *3*, 142.
  - 21 World Health Organization, Guidelines for the treatment of malaria. Third edition ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=1)), abgerufen am 11.04.2016.
  - 22 White, N. J., Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemisinin and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *88*, 41–43.
  - 23 Ashley, E. A.; Dhorda, M.; Fairhurst, R. M.; Amaratunga, C.; Lim, P.; Suon, S.; Sreng, S.; Anderson, J. M.; Mao, S.; Sam, B.; Sopha, C.; Chuor, C. M.; Nguon, C.; Sovannaroeth, S.; Pukrittayakamee, S.; Jittamala, P.; Chotivanich, K.; Chutasmit, K.; Suchatsoonthorn, C.; Runchaoen, R.; Hien, T. T.; Thuy-Nhien, N. T.; Thanh, N. V.; Phu, N. H.; Htut, Y.; Han, K.-T.; Aye, K. H.; Mokuolu, O. A.; Olaosebikan, R. R.; Folaranmi, O. O.; Mayxay, M.; Khanthavong, M.; Hongvanthong, B.; Newton, P. N.; Onyamboko, M. A.; Fanello, C. I.; Tshefu, A. K.; Mishra, N.; Valecha, N.; Phyto, A. P.; Nosten, F.; Yi, P.; Tripura, R.; Borrmann, S.; Bashraheil, M.; Peshu, J.; Faiz, M. A.; Ghose, A.; Hossain, M. A.; Samad, R.; Rahman, M. R.; Hasan, M. M.; Islam, A.; Miotto, O.; Amato, R.; MacInnis, B.; Stalker, J.; Kwiatkowski, D. P.; Bozdech, Z.; Jeeyapant, A.; Cheah, P. Y.; Sakulthaew, T.; Chalk, J.; Intharabut, B.; Silamut, K.; Lee, S. J.; Vihokhern, B.; Kunasol, C.; Imwong, M.; Tarning, J.; Taylor, W. J.; Yeung, S.; Woodrow, C. J.; Flegg, J. A.; Das, D.; Smith, J.; Venkatesan, M.; Plowe, C. V.; Stepniewska, K.; Guerin, P. J.; Dondorp, A. M.; Day, N. P.; White, N.

- J., Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 371, 411–423.
- 24 Arieu, F.; Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Beghain, J.; Langlois, A.-C.; Khim, N.; Kim, S.; Duru, V.; Bouchier, C.; Ma, L.; Lim, P.; Leang, R.; Duong, S.; Sreng, S.; Suon, S.; Chuor, C. M.; Bout, D. M.; Menard, S.; Rogers, W. O.; Genton, B.; Fandeur, T.; Miotto, O.; Ringwald, P.; Le Bras, J.; Berry, A.; Barale, J.-C.; Fairhurst, R. M.; Benoit-Vical, F.; Mercereau-Puijalon, O.; Menard, D., A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2014**, 505, 50–55.
- 25 Pukrittayakamee, S.; Chotivanich, K.; Chantira, A.; Clemens, R.; Looareesuwan, S.; White, N. J., Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in *falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1329–1334.
- 26 Barnett, D. S.; Guy, R. K., Antimalarials in development in 2014. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 11221–11241.
- 27 Klayman, D., Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **1985**, 228, 1049–1055.
- 28 O'Neill, P. M.; Barton, V. E.; Ward, S. A., The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules* **2010**, 15, 1705–1721.
- 29 Meshnick, S. R.; Thomas, A.; Ranz, A.; Xu, C. M.; Pan, H. Z., Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, 49, 181–189.
- 30 Yang, Y. Z.; Little, B.; Meshnick, S. R., Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 569–573.
- 31 Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; Van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S., Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2003**, 424, 957–961.

- 32 Kumura, N.; Furukawa, H.; Onyango, A. N.; Izumi, M.; Nakajima, S.; Ito, H.; Hatano, T.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Baba, N., Different behavior of artemisinin and tetraoxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *160*, 114–120.
- 33 Wells, T. N. C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C., Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 424–442.
- 34 Kaufman, T. S.; Rúveda, E. A., The quest for quinine: Those who won the battles and those who won the war. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 854–885.
- 35 Dondorp, A. M.; Fanello, C. I.; Hendriksen, I. C. E.; Gomes, E.; Seni, A.; Chhaganlal, K. D.; Bojang, K.; Olaosebikan, R.; Anunobi, N.; Maitland, K.; Kivaya, E.; Agbenyega, T.; Nguah, S. B.; Evans, J.; Gesase, S.; Kahabuka, C.; Mtove, G.; Nadjm, B.; Deen, J.; Mwanga-Amumpaire, J.; Nansumba, M.; Karema, C.; Umulisa, N.; Uwimana, A.; Mokuolu, O. A.; Adedoyin, O. T.; Johnson, W. B. R.; Tshefu, A. K.; Onyamboko, M. A.; Sakulthaew, T.; Ngum, W. P.; Silamut, K.; Stepniewska, K.; Woodrow, C. J.; Bethell, D.; Wills, B.; Oneko, M.; Peto, T. E.; Seidlein, L. von; Day, N. P. J.; White, N. J., Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*, *376*, 1647–1657.
- 36 Fitch, C. D., Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957–1972.
- 37 Sullivan, D. J., Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1645–1653.
- 38 Petersen, I.; Eastman, R.; Lanzer, M., Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Letters* **2011**, *585*, 1551–1562.
- 39 Okombo, J.; Kiara, S. M.; Rono, J.; Mwai, L.; Pole, L.; Ohuma, E.; Borrmann, S.; Ochola, L. I.; Nzila, A., *In vitro* activities of quinine and other antimalarials and *pfpr* polymorphisms in *Plasmodium* isolates from Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3302–3307.

- 40 Cheruiyot, J.; Ingasia, L. A.; Omondi, A. A.; Juma, D. W.; Opot, B. H.; Ndegwa, J. M.; Mativo, J.; Cheruiyot, A. C.; Yeda, R.; Okudo, C.; Muiruri, P.; Bidii, N. S.; Chebon, L. J.; Angienda, P. O.; Eyase, F. L.; Johnson, J. D.; Bulimo, W. D.; Andagalu, B.; Akala, H. M.; Kamau, E., Polymorphisms in *pfmdr1*, *pfcr1*, and *pfhhe1* genes are associated with reduced *in vitro* activities of quinine in *Plasmodium falciparum* isolates from western Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3737–3743.
- 41 Bouchaud, O.; Imbert, P.; Touze, J. E.; Dodoo, A. N. O.; Danis, M.; Legros, F., Fatal cardiotoxicity related to halofantrine: a review based on a worldwide safety data base. *Malar. J.* **2009**, *8*, 1–8.
- 42 Croft, A. M., A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J. R. Soc. Med.* **2007**, *100*, 170–174.
- 43 Bray, P. G.; Martin, R. E.; Tilley, L.; Ward, S. A.; Kirk, K.; Fidock, D. A., Defining the role of *PfCRT* in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 323–333.
- 44 Watkins, W. M.; Sixsmith, D. G.; Spencer, H. C.; Boriga, D. A.; Kariuki, D. M.; Kipingor, T.; Koech, D. K., Effectiveness of amodiaquine as treatment for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections in Kenya. *Lancet* **1984**, *1*, 357–359.
- 45 AlKadi, H. O., Antimalarial drug toxicity: A review. *Chemotherapy* **2007**, *53*, 385–391.
- 46 D'alessandro, U., Progress in the development of piperazine combinations for the treatment of malaria. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2009**, *22*, 588–592.
- 47 Davis, T. M. E.; Hung, T.-Y.; Sim, I.-K.; Karunajeewa, H. A.; Ilett, K. F., Piperazine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs* **2005**, *65*, 75–87.
- 48 Beutler, E.; Duparc, S., Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 779–789.

- 49 Price, R. N.; Nosten, F., Single-dose radical cure of *Plasmodium vivax*: a step closer. *Lancet* **2014**, *383*, 1020–1021.
- 50 Fry, M.; Pudney, M., Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1545–1553.
- 51 White, N. J.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T. T.; Faiz, M. A.; Mokuolu, O. A.; Dondorp, A. M., Malaria. *Lancet* **2014**, *383*, 723–735.
- 52 Plowe, C. V.; Djimde, A.; Bouare, M.; Doumbo, O.; Wellems, T. E., Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *52*, 565–568.
- 53 Gatton, M. L.; Martin, L. B.; Cheng, Q., Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2116–2123.
- 54 Cowman, A. F.; Morry, M. J.; Biggs, B. A.; Cross, G. A.; Foote, S. J., Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 9109–9113.
- 55 Triglia, T.; Menting, J. G.; Wilson, C.; Cowman, A. F., Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 13944–13949.
- 56 Yuthavong, Y.; Tarnchompoo, B.; Vilaivan, T.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Charman, S. A.; McLennan, D. N.; White, K. L.; Vivas, L.; Bongard, E.; Thongphanchang, C.; Taweekhai, S.; Vanichtanankul, J.; Rattanajak, R.; Arwon, U.; Fantauzzi, P.; Yuvaniyama, J.; Charman, W. N.; Matthews, D., Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 16823–16828.

- 57 Medicines for Malaria Venture, Interactive R&D portfolio  
(<http://www.mmv.org/research-development/interactive-rd-portfolio>),  
abgerufen am 31.05.2016.
- 58 White, N. J.; Pukrittayakamee, S.; Phyo, A. P.; Rueangweerayut, R.; Nosten, F.; Jittamala, P.; Jeeyapant, A.; Jain, J. P.; Lefèvre, G.; Li, R.; Magnusson, B.; Diagana, T. T.; Leong, F. J., Spiroindolone KAE609 for *falciparum* and *vivax* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 403–410.
- 59 Jiménez-Díaz, M. B.; Ebert, D.; Salinas, Y.; Pradhan, A.; Lehane, A. M.; Myrand-Lapierre, M.-E.; O’Loughlin, K. G.; Shackleford, D. M.; Justino de Almeida, M.; Carrillo, A. K.; Clark, J. A.; Adelaide, D. S. M.; Diep, J.; Deng, X.; Duffy, S.; Endsley, A. N.; Fedewa, G.; Guiguemde, W. A.; Gómez, M. G.; Holbrook, G.; Horst, J.; Kim, C. C.; Liu, J.; Lee, M. C. S.; Matheny, A.; Martínez, M. S.; Miller, G.; Rodríguez-Alejandre, A.; Sanz, L.; Sigal, M.; Spillman, N. J.; Stein, P. D.; Wang, Z.; Zhu, F.; Waterson, D.; Knapp, S.; Shelat, A.; Avery, V. M.; Fidock, D. A.; Gamo, F.-J.; Charman, S. A.; Mirsalis, J. C.; Ma, H.; Ferrer, S.; Kirk, K.; Angulo-Barturen, I.; Kyle, D. E.; DeRisi, J. L.; Floyd, D. M.; Guy, R. K., (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, E5455-E5462.
- 60 Kuhen, K. L.; Chatterjee, A. K.; Rottmann, M.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Buenviaje, J.; Chen, Z.; Francek, C.; Wu, T.; Nagle, A.; Barnes, S. W.; Plouffe, D.; Lee, M. C. S.; Fidock, D. A.; Graumans, W.; van de Vegte-Bolmer, M.; van Gemert, G. J.; Wirjanata, G.; Sebayang, B.; Marfurt, J.; Russell, B.; Suwanarusk, R.; Price, R. N.; Nosten, F.; Tungtaeng, A.; Gettayacamin, M.; Sattabongkot, J.; Taylor, J.; Walker, J. R.; Tully, D.; Patra, K. P.; Flannery, E. L.; Vinetz, J. M.; Renia, L.; Sauerwein, R. W.; Winzeler, E. A.; Glynn, R. J.; Diagana, T. T., KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5060–5067.

- 61 Phillips, M. A.; Lotharius, J.; Marsh, K.; White, J.; Dayan, A.; White, K. L.; Njoroge, J. W.; El Mazouni, F.; Lao, Y.; Kokkonda, S.; Tomchick, D. R.; Deng, X.; Laird, T.; Bhatia, S. N.; March, S.; Ng, C. L.; Fidock, D. A.; Wittlin, S.; Lafuente-Monasterio, M.; Gamo Benito, F. J.; Sanz Alonso, L. M.; Martinez, M. S.; Jimenez-Diaz, M. B.; Bazaga, S. F.; Angulo-Barturen, I.; Haselden, J. N.; Louttit, J.; Cui, Y.; Sridhar, A.; Zeeman, A.-M.; Kocken, C.; Sauerwein, R.; Dechering, K.; Avery, V. M.; Duffy, S.; Delves, M.; Sinden, R.; Ruecker, A.; Wickham, K. S.; Rochford, R.; Gahagen, J.; Iyer, L.; Riccio, E.; Mirsalis, J.; Bathhurst, I.; Rueckle, T.; Ding, X.; Campo, B.; Leroy, D.; Rogers, M. J.; Rathod, P. K.; Burrows, J. N.; Charman, S. A., A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 296ra111.
- 62 Ghidelli-Disse, S.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Waterson, D.; Witty, M.; Younis, Y.; Paquet, T.; Street, L. J.; Chibale, K.; Gamo-Benito, F. J.; Bantscheff, M.; Drewes, G., Identification of *Plasmodium* PI4 kinase as target of MMV390048 by chemoproteomics. *Malar. J.* **2014**, *13*, P38.
- 63 Klebe, G., *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage, **2009**. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 96-100.
- 64 Landry, Y.; Gies, J.-P., Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2008**, *22*, 1–18.
- 65 Butera, J. A., Phenotypic screening as a strategic component of drug discovery programs targeting novel antiparasitic and antimycobacterial agents: an editorial. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7715–7718.
- 66 Gilbert, I. H., Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7719–7726.
- 67 Njoroge, M.; Njuguna, N. M.; Mutai, P.; Ongarora, Dennis S B; Smith, P. W.; Chibale, K., Recent approaches to chemical discovery and development against malaria and the neglected tropical diseases human African trypanosomiasis and schistosomiasis. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11138–11163.

- 68 Coteron, J. M.; Marco, M.; Esquivias, J.; Deng, X.; White, K. L.; White, J.; Koltun, M.; El Mazouni, F.; Kokkonda, S.; Katneni, K.; Bhamidipati, R.; Shackleford, D. M.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S. B.; Jiménez-Díaz, M. B.; Gamo, F.-J.; Goldsmith, E. J.; Charman, W. N.; Bathurst, I.; Floyd, D.; Matthews, D.; Burrows, J. N.; Rathod, P. K.; Charman, S. A.; Phillips, M. A., Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5540–5561.
- 69 Sykes, M. L.; Avery, V. M., Approaches to protozoan drug discovery: Phenotypic screening. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7727–7740.
- 70 Plouffe, D.; Brinker, A.; McNamara, C.; Henson, K.; Kato, N.; Kuhen, K.; Nagle, A.; Adrián, F.; Matzen, J. T.; Anderson, P.; Nam, T.-G.; Gray, N. S.; Chatterjee, A.; Janes, J.; Yan, S. F.; Trager, R.; Caldwell, J. S.; Schultz, P. G.; Zhou, Y.; Winzeler, E. A., *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 9059–9064.
- 71 Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, Ghislain M C; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T.-G.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A., Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, *334*, 1372–1377.
- 72 Gamo, F.-J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; Cozar, C. de; Alvarez, E.; Lavandera, J.-L.; Vanderwall, D. E.; Green, Darren V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F., Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305–310.



- 73 Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martinez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; Mazouni, F. E.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; DeRisi, J. L.; Sullivan, D. J.; Lazo, J. S.; Roos, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C.; Avery, V. M.; Guy, R. K., Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, *465*, 311–315.
- 74 Edlin, C. D.; Morgans, G.; Winks, S.; Duffy, S.; Avery, V. M.; Wittlin, S.; Waterson, D.; Burrows, J.; Bryans, J., Identification and *in-vitro* ADME assessment of a series of novel anti-malarial agents suitable for hit-to-lead chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 570–573.
- 75 González Cabrera, D.; Douelle, F.; Feng, T.-S.; Nchinda, A. T.; Younis, Y.; White, K. L.; Wu, Q.; Ryan, E.; Burrows, J. N.; Waterson, D.; Witty, M. J.; Wittlin, S.; Charman, S. A.; Chibale, K., Novel orally active antimalarial thiazoles. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7713–7719.
- 76 Younis, Y.; Douelle, F.; Feng, T.-S.; Cabrera, D. G.; Le Manach, C.; Nchinda, A. T.; Duffy, S.; White, K. L.; Shackleford, D. M.; Morizzi, J.; Mannila, J.; Katneni, K.; Bhamidipati, R.; Zabiulla, K. M.; Joseph, J. T.; Bashyam, S.; Waterson, D.; Witty, M. J.; Hardick, D.; Wittlin, S.; Avery, V.; Charman, S. A.; Chibale, K., 3,5-Diaryl-2-aminopyridines as a novel class of orally active antimalarials demonstrating single dose cure in mice and clinical candidate potential. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3479–3487.
- 77 Avery, V. M.; Bashyam, S.; Burrows, J. N.; Duffy, S.; Papadatos, G.; Puthukkuti, S.; Sambandan, Y.; Singh, S.; Spangenberg, T.; Waterson, D.; Willis, P., Screening and hit evaluation of a chemical library against blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **2014**, *13*, 190.
- 78 Baragaña, B.; Hallyburton, I.; Lee, M. C. S.; Norcross, N. R.; Grimaldi, R.; Otto, T. D.; Proto, W. R.; Blagborough, A. M.; Meister, S.; Wirjanata, G.; Ruecker, A.;

- Upton, L. M.; Abraham, T. S.; Almeida, M. J.; Pradhan, A.; Porzelle, A.; Martínez, M. S.; Bolscher, J. M.; Woodland, A.; Norval, S.; Zuccotto, F.; Thomas, J.; Simeons, F.; Stojanovski, L.; Osuna-Cabello, M.; Brock, P. M.; Churcher, T. S.; Sala, K. A.; Zakutansky, S. E.; Jiménez-Díaz, M. B.; Sanz, L. M.; Riley, J.; Basak, R.; Campbell, M.; Avery, V. M.; Sauerwein, R. W.; Dechering, K. J.; Noviyanti, R.; Campo, B.; Frearson, J. A.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer-Bazaga, S.; Gamo, F. J.; Wyatt, P. G.; Leroy, D.; Siegl, P.; Delves, M. J.; Kyle, D. E.; Wittlin, S.; Marfurt, J.; Price, R. N.; Sinden, R. E.; Winzeler, E. A.; Charman, S. A.; Bebrevska, L.; Gray, D. W.; Campbell, S.; Fairlamb, A. H.; Willis, P. A.; Rayner, J. C.; Fidock, D. A.; Read, K. D.; Gilbert, I. H., A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* **2015**, 522, 315–320.
- 79 Rueda, L.; Castellote, I.; Castro-Pichel, J.; Chaparro, M. J.; de la Rosa, J. C.; Garcia-Perez, A.; Gordo, M.; Jimenez-Diaz, M. B.; Kessler, A.; Macdonald, S. J. F.; Martinez, M. S.; Sanz, L. M.; Gamo, F. J.; Fernandez, E., Cyclopropyl carboxamides: A new oral antimalarial series derived from the Tres Cantos Anti-Malarial Set (TCAMS). *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 840–844.
- 80 Chaparro, M. J.; Vidal, J.; Angulo-Barturen, I.; Bueno, J. M.; Burrows, J.; Cammack, N.; Castañeda, P.; Colmenarejo, G.; Coterón, J. M.; de Las Heras, L.; Fernández, E.; Ferrer, S.; Gabarró, R.; Gamo, F. J.; García, M.; Jiménez-Díaz, M. B.; Lafuente, M. J.; León, M. L.; Martínez, M. S.; Minick, D.; Prats, S.; Puente, M.; Rueda, L.; Sandoval, E.; Santos-Villarejo, A.; Witty, M.; Calderón, F., Case study of small molecules as antimalarials: 2-Amino-1-phenylethanol (APE) derivatives. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 657–661.
- 81 Meyers, M. J.; Tortorella, M. D.; Xu, J.; Qin, L.; He, Z.; Lang, X.; Zeng, W.; Xu, W.; Qin, L.; Prinsen, M. J.; Sverdrup, F. M.; Eickhoff, C. S.; Griggs, D. W.; Oliva, J.; Ruminski, P. G.; Jacobsen, E. J.; Campbell, M. A.; Wood, D. C.; Goldberg, D. E.; Liu, X.; Lu, Y.; Lu, X.; Tu, Z.; Lu, X.; Ding, K.; Chen, X., Evaluation of aminohydantoins as a novel class of antimalarial agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 89–93.

- 82 McConville, M.; Fernández, J.; Angulo-Barturen, Í.; Bahamontes-Rosa, N.; Ballell-Pages, L.; Castañeda, P.; Cózar, C. de; Crespo, B.; Guijarro, L.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martínez-Martínez, M. S.; Mercado, J. de; Santos-Villarejo, Á.; Sanz, L. M.; Frigerio, M.; Washbourn, G.; Ward, S. A.; Nixon, G. L.; Biagini, G. A.; Berry, N. G.; Blackman, M. J.; Calderón, F.; O'Neill, P. M., Carbamoyl triazoles, known serine protease inhibitors, are a potent new class of antimalarials. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6448–6455.
- 83 Trager, W., Loose ends: axenic culture, parasitophorous vacuoles, bird malaria. *Parassitologia* **2002**, *44*, 117–121.
- 84 Spry, C.; Kirk, K.; Saliba, K. J., Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 56–106.
- 85 Genschel, U., Coenzyme A biosynthesis: reconstruction of the pathway in archaea and an evolutionary scenario based on comparative genomics. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1242–1251.
- 86 Pinney, J. W.; Shirley, M. W.; McConkey, G. A.; Westhead, D. R., metaSHARK: software for automated metabolic network prediction from DNA sequence and its application to the genomes of *Plasmodium falciparum* and *Eimeria tenella*. *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1399–1409.
- 87 Saliba, K. J.; Spry, C., Exploiting the coenzyme A biosynthesis pathway for the identification of new antimalarial agents: the case for pantothenamides. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1087–1093.
- 88 Plata, G.; Hsiao, T.-L.; Olszewski, K. L.; Llinás, M.; Vitkup, D., Reconstruction and flux-balance analysis of the *Plasmodium falciparum* metabolic network. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 408.
- 89 Huthmacher, C.; Hoppe, A.; Bulik, S.; Holzhütter, H.-G., Antimalarial drug targets in *Plasmodium falciparum* predicted by stage-specific metabolic network analysis. *BMC Syst. Biol.* **2010**, *4*, 1–27.

- 90 Fletcher, S.; Avery, V. M., A novel approach for the discovery of chemically diverse anti-malarial compounds targeting the *Plasmodium falciparum* Coenzyme A synthesis pathway. *Malar. J.* **2014**, *13*, 343.
- 91 Bahl, A.; Brunk, B.; Coppel, R. L.; Crabtree, J.; Diskin, S. J.; Fraunholz, M. J.; Grant, G. R.; Gupta, D.; Huestis, R. L.; Kissinger, J. C.; Labo, P.; Li, L.; McWeeney, S. K.; Milgram, A. J.; Roos, D. S.; Schug, J.; Stoeckert, C. J., PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished). *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 87–90.
- 92 Saliba, K. J.; Kirk, K., H<sup>+</sup>-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18115–18121.
- 93 Saliba, K. J.; Horner, H. A.; Kirk, K., Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10190–10195.
- 94 Ginsburg, H.; Stein, W. D., The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: Comparison of results using different experimental techniques. *J. Membr. Biol.* **2004**, *197*, 113–134.
- 95 Brackett, S.; Waletzky, E.; Baker, M., The relation between panthothenic acid and *Plasmodium gallinaceum* infections in the chicken and the antimalarial activity of analogues of pantothenic acid. *J. Parasitol.* **1946**, *32*, 453–462.
- 96 Strauss, E.; Begley, T. P., The antibiotic activity of *N*-pentylpantothenamide results from its conversion to ethyldethia-coenzyme a, a coenzyme a antimetabolite. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48205–48209.
- 97 Choudhry, A. E.; Mandichak, T. L.; Broskey, J. P.; Egolf, R. W.; Kinsland, C.; Begley, T. P.; Seefeld, M. A.; Ku, T. W.; Brown, J. R.; Zalacain, M.; Ratnam, K., Inhibitors of pantothenate kinase: novel antibiotics for staphylococcal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2051–2055.

- 98 Spry, C.; Macuamule, C.; Lin, Z.; Virga, K. G.; Lee, R. E.; Strauss, E.; Saliba, K. J., Pantothenamides are potent, on-target inhibitors of *Plasmodium falciparum* growth when serum pantetheinase is inactivated. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54974.
- 99 Pett, H. E.; Jansen, P. A. M.; Hermkens, P. H. H.; Botman, P. N. M.; Beuckens-Schortinghuis, C. A.; Blaauw, R. H.; Graumans, W.; van de Vegte-Bolmer, M.; Koolen, K. M. J.; Rutjes, F. P. J. T.; Dechering, K. J.; Sauerwein, R. W.; Schalkwijk, J., Novel pantothenate derivatives for anti-malarial chemotherapy. *Malar. J.* **2015**, *14*, 169.
- 100 Spangenberg, T.; Burrows, J. N.; Kowalczyk, P.; McDonald, S.; Wells, T. N. C.; Willis, P., The open access Malaria Box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62906.
- 101 Arrowsmith, R. J.; Dann, J. G.; Franzmann, K. W.; Hodgson, S. T.; Wates, P. J., Preparation of anti-atherosclerotic diaryl compounds, *PCT Int. Appl.* **1995**, WO 9501326 A1 19950112.
- 102 O'Brien, P. J.; Irwin, W.; Diaz, D.; Howard-Cofield, E.; Krejsa, C. M.; Slaughter, M. R.; Gao, B.; Kaludercic, N.; Angeline, A.; Bernardi, P.; Brain, P.; Hougham, C., High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 580–604.
- 103 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- 104 Calderón, F.; Barros, D.; Bueno, J. M.; Coterón, J. M.; Fernández, E.; Gamo, F. J.; Lavandera, J. L.; León, M. L.; Macdonald, S. J. F.; Mallo, A.; Manzano, P.; Porras, E.; Fiandor, J. M.; Castro, J., An invitation to open innovation in malaria drug discovery: 47 quality starting points from the TCAMS. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 741–746.
- 105 Becker, H. G. O.; Beckert, R., *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 23. Aufl., **2009**. Wiley-VCH, Weinheim, 485.

- 106 Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P., Coupling N-methylated amino acids using PyBroP and PyCloP halogenophosphonium salts. Mechanism and fields of application. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437–2446.
- 107 Ramana, D. V.; Vairamani, M.; Kala, S., Electron-impact-induced hydrogen migration in organic molecules. I-Substituent effects in the mass spectra of pivalanilides. *Org. Mass Spectrom.* **1975**, *10*, 196–199.
- 108 Hammerum, S.; Wolkoff, P.; Ullenius, C.; Henriksen, L.; Nørskov, L.; Schroll, G., Structure and reactions of the  $C_6H_7N^+$  and  $C_6H_6N^+$  ions formed from phenylurethane on electron impact. *Acta Chem. Scand.* **1977**, *31b*, 871–874.
- 109 Kitano, T.; Hieda, M.; Yaegashi, K.; Igi, K., Method for the preparation of phenoxazine derivative. **2011**, KR2011129822A.
- 110 Oliveira, C. S. de; Lira, B. F.; Barbosa-Filho, J. M.; Lorenzo, J. G. F.; Athayde-Filho, P. F. de, Synthetic approaches and pharmacological activity of 1,3,4-oxadiazoles: a review of the literature from 2000-2012. *Molecules* **2012**, *17*, 10192–10231.
- 111 Nagaraj; Chaluvvaraju, K. C.; Niranjan, M. S.; Kiran, S., 1,3,4-Oxadiazole: a potent drug candidate with various pharmacological activities. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *3*, 9–16.
- 112 Bostrom, J.; Hogner, A.; Llinas, A.; Wellner, E.; Plowright, A. T., Oxadiazoles in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1817–1830.
- 113 Khalilullah, H.; J. Ahsan, M.; Hedaitullah, M.; Khan, S.; Ahmed, B., 1,3,4-Oxadiazole: a biologically active scaffold. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 789–801.
- 114 Jansen, M.; Rabe, H.; Strehle, A.; Dieler, S.; Debus, F.; Dannhardt, G.; Akabas, M. H.; Lüddens, H., Synthesis of GABA A receptor agonists and evaluation of their  $\alpha$ -subunit selectivity and orientation in the GABA binding site. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4430–4448.

- 115 Tipericiuc, B.; Zaharia, V.; Colosi, I.; Moldovan, C.; Crişan, O.; Pîrnau, A.; Vlase, L.; Duma, M.; Oniga, O., Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of some new hetaryl-azoles derivatives obtained from 2-aryl-4-methylthiazol-5-carbohydrazides and isonicotinic acid hydrazide. *J. Heterocyclic Chem.* **2012**, *49*, 1407–1414.
- 116 Browne, E. J.; Polya, J. B., 991. Triazoles. Part VII. Syntheses of substituted 1,2,4-triazoles. *J. Chem. Soc.* **1962**, 5149.
- 117 Arslan, N. B.; Özdemir, N.; Dayan, O.; Dege, N.; Koparır, M.; Koparır, P.; Muğlu, H., Direct and solvent-assisted thione–thiol tautomerism in 5-(thiophen-2-yl)-1,3,4-oxadiazole-2(3*H*)-thione. Experimental and molecular modeling study. *Chem. Phys.* **2014**, *439*, 1–11.
- 118 Aranda, G.; Dessolin, M.; Golfier, M.; Guillerez, M.-G., <sup>13</sup>C NMR study of some derivatives of 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and isosydnone. *Org. Magn. Resonance* **1982**, *18*, 159–164.
- 119 Manjunatha, K.; Poojary, B.; Lobo, P. L.; Fernandes, J.; Kumari, N. S., Synthesis and biological evaluation of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5225–5233.
- 120 Chang, L.; Lee, S.-Y.; Leonczak, P.; Rozenski, J.; Jonghe, S. de; Hanck, T.; Müller, C. E.; Herdewijn, P., Imidazopyridine- and purine-thioacetamide derivatives: potent inhibitors of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10080–10100.
- 121 Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl., **2005**. Thieme, Stuttgart, New York, 99-104.
- 122 Günther, H., *NMR-Spektroskopie. Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13 Kernresonanz-Spektroskopie*. 3. Aufl., **1992**. Georg Thieme, New York, 303-350.
- 123 Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl., **2005**. Thieme, Stuttgart, New York, 174.

- 124 Ortega-Luoni, P.; Vera, L.; Astudillo, C.; Guzmán, M.; Ortega-López, P., Synthesis of metallic azoderivatives of 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole. *J. Chil. Chem. Soc.* **2007**, 52.
- 125 Ding, Y.; Zhang, Y.-Y.; Zhang, J.; Chen, Y.-Q., Syntheses and anticancer activity of ribonucleoside analogues containing thio-substituted five-membered heterocyclic base. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1607–1610.
- 126 Lv, Y.; Li, M.; Liu, T.; Tong, L.; Peng, T.; Wei, L.; Ding, J.; Xie, H.; Duan, W., Discovery of a new series of naphthamides as potent VEGFR-2 kinase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 592–597.
- 127 Smith, A. L.; Andrews, K. L.; Beckmann, H.; Bellon, S. F.; Beltran, P. J.; Booker, S.; Chen, H.; Chung, Y.-A.; D'Angelo, N. D.; Dao, J.; Dellamaggiore, K. R.; Jaeckel, P.; Kendall, R.; Labitzke, K.; Long, A. M.; Materna-Reichert, S.; Mitchell, P.; Norman, M. H.; Powers, D.; Rose, M.; Shaffer, P. L.; Wu, M. M.; Lipford, J. R., Discovery of 1*H*-pyrazol-3(2*H*)-ones as potent and selective inhibitors of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 1426–1441.
- 128 Garnier, E.; Audoux, J.; Pasquinet, E.; Suzenet, F.; Poullain, D.; Lebreton, B.; Guillaumet, G., Easy access to 3- or 5-heteroaryl-amino-1,2,4-triazines by  $S_NAr$ ,  $S_N^H$ , and palladium-catalyzed N-heteroarylations. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7809–7815.
- 129 Becker, H. G. O.; Beckert, R., *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 23. Aufl., **2009**. Wiley-VCH, Weinheim, 156-157.
- 130 El Ashry, e. S. H.; El Tamany, e. S. H.; Aly, M. R. E.; Boraie, A. T. A., N-2-glycosyl thiosemicarbazides from N-3-glycosyl oxadiazolinethiones obtained from 2-S-glycosyl oxadiazolines via mild thermal S→N migration of the glycosyl moiety. *Synlett* **2010**, 2247–2250.
- 131 El Ashry, e. S. H.; El Tamany, e. S. H.; Fattah, M. e. D. A.; Aly, M. R. E.; Boraie, A. T. A.; Duerkop, A., A new synthetic access to 2-N-(glycosyl)thiosemicarbazides from 3-N-(glycosyl)oxadiazolinethiones and the regioselectivity of the



- glycosylation of their oxadiazolinethione precursors. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 135–146.
- 132 Walliker, D.; Quakyi, I.; Wellem, T.; McCutchan, T.; Szarfman, A.; London, W.; Corcoran, L.; Burkot, T.; Carter, R., Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **1987**, 236, 1661–1666.
- 133 Eddershaw, P. J.; Beresford, A. P.; Bayliss, M. K., ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 409–414.
- 134 Lipinski, C. A., Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, 44, 235–249.
- 135 Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K., Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 2012, 195727.
- 136 Stegemann, S.; Leveiller, F.; Franchi, D.; Jong, H. de; Linden, H., When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, 31, 249–261.
- 137 chemicalize.org wurde zur Vorhersage des logP verwendet, August, 2016, chemicalize.org und ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- 138 Wölfel, S., *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**. Shaker Verlag, Aachen, 77-80.
- 139 Yalkowsky, S. H., Solubility and partitioning V. Dependence of solubility on melting point. *J. Pharm. Sci.* **1981**, 70, 971–973.
- 140 Ran, Y.; Yalkowsky, S. H., Prediction of drug solubility by the general solubility equation (GSE). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 354–357.
- 141 Kerns, E. H.; Di, L.; Carter, G. T., In vitro solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug. Metab.* **2008**, 9, 879–885.
- 142 Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L., *Purification of laboratory chemicals*. 6. Aufl., **2009**. Elsevier/Butterworth-Heinemann, Amsterdam, Boston, 123.

- 143 Armarego, W. L. F; Chai, C. L. L., *Purification of laboratory chemicals*. 6. Aufl., **2009**. Elsevier/Butterworth-Heinemann, Amsterdam, Boston, 386f.
- 144 Armarego, W. L. F; Chai, C. L. L., *Purification of laboratory chemicals*. 6. Aufl., **2009**. Elsevier/Butterworth-Heinemann, Amsterdam, Boston, 434.
- 145 Armarego, W. L. F; Chai, C. L. L., *Purification of laboratory chemicals*. 6. Aufl., **2009**. Elsevier/Butterworth-Heinemann, Amsterdam, Boston, 343.
- 146 Pissiotas, G.; Rohr, O.; Kristinsson, H., Heterocyclyloxyphenylureas, *Ger. Offen.* **1982**, DE 3145422 A1 19820701.
- 147 Wölfel, S., *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**. Shaker Verlag, Aachen, 124-125.
- 148 Mndzhoyan, A. L.; Tatevosyan, G. T.; Agbalyan, S. G.; Divanyan, N. M., Furan derivatives. XVI. Some furan derivatives containing bivalent sulfur. *Dokl. Akad. Nauk Arm. SSR* **1957**, 25, 207–211.
- 149 Schlütke, L. M., *Neue Purinderivate als Inhibitoren der Proteinkinase ALK*. Dissertation Technische Universität Braunschweig **2016**, 169.
- 150 Yutilov, Y. M.; Svertilova, I. A., Thionation of imidazopyridines. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1988**, 799–804.
- 151 Cox, J. M.; Marsden, John Henry Edgar; Burrell, R. A.; Elmore, N.; Shephard, M. C., Thienopyrimidine derivative compositions for controlling fungal, viral and bacterial plant diseases and insect damage, *Ger. Offen.* **1977**, DE2654090A1.
- 152 Akbari, V. K.; Patel, K. C.; Patel, P. D., Synthesis, characterization and biological evaluation of some new thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. *Int. J. ChemTech Res.* **2013**, 5, 142–155.
- 153 Glomme, A.; Marz, J.; Dressman, J. B., Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 1–16.

- 154 *Europäisches Arzneibuch*. 8. Ausgabe, einschließlich 1. bis 6. Nachtrag, **2014**. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 6768.
- 155 Dzikowski, R.; Frank, M.; Deitsch, K., Mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites is regulated independently of antigen production. *PLoS Pathog.* **2006**, 2, e22.
- 156 Duffy, S.; Avery, V. M., Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, 86, 84–92.
- 157 Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R., A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67–73.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben:

Ich möchte zuallererst meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Conrad Kunick danken, dass er mich vor drei Jahren relativ kurzfristig in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat und mich mit einem sehr interessanten Thema ausgestattet hat. Des Weiteren möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung, die guten Ratschläge, aber auch für die überlassenen Freiheiten bei der Gestaltung des Themas bedanken. Herrn Prof. Dr. Knut Baumann danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Ron Dzikowski der Hebrew University in Jerusalem, in dessen Laboratorien die Untersuchungen an den Malariaerregern durchgeführt wurden. Für die zuverlässige Durchführung und Auswertung der Proliferationsassays möchte ich ganz herzlich Dr. Abed Nasereddin danken, ohne deren Ergebnisse die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank auch für die spannende Führung durch Bethlehem. Zudem möchte ich Prof. Dr. Vicky Avery und Dr. Leonardo Lucantoni von der Griffith University in Australien für die Durchführung und Auswertung der Coenzym A-Sublimations-Assays danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Lutz Preu für sein offenes Ohr bei NMR-Problemen und vor allem für die Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge bei der Strukturaufklärung der Konstitutionsisomere. Danken möchte ich auch Dr. Johann Grünefeld für seine fachliche Expertise bei Synthesefragen und einen schönen gemeinsamen Aufenthalt in Haifa.

Ich möchte zudem Sandra Meyer und Petra Reich der analytischen Abteilung für das Einwiegen von Substanzproben, Lösen von NMR-Proben und die Messung von IR-Spektren und Elementaranalysen danken. Mein Dank gilt auch Dr. Kerstin Ibrom, Petra Holba-Schulz und Gabriele Krafft der NMR-Abteilung des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie für die Messung der NMR-Spektren. Außerdem danke ich Prof. Dr. Jones vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie und seinem Team für die

Aufnahme und Auswertung der Röntgenkristallstrukturen. Dr. Ulrich Papke, Dr. Hans Martin Schiebel vom Institut für Organische Chemie möchte ich danken für die Ratschläge bei der Auswertung der Massenspektren. Ihnen und Cornelia Mlynek danke ich auch für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Des Weiteren möchte ich Klaus Hartmann und Matthias Söchtig für die Versorgung mit Chemikalien und die Fußball-Fachgespräche danken. Frank Röse und Eduard Hinz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen. Zudem gilt mein Dank Britta Thomas, Thomas Hofmann, Robert Hübner und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie.

Besonders bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mietgliedern des Arbeitskreises für die sehr angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Diese sind: Dr. Hannes Falke, Dr. Sebastian Wölfel, Dr. Anne Walter, Dr. Hoang Lande, Dr. Laura Schlütke, Andreas Masch, Oliver Orban, Rosanna Meine und Christian Lechner. Ich möchte euch allen recht herzlich für das super Arbeitsklima, gute Diskussionen und Ratschläge, motivierende Worte und auch für die manchmal nötige Ablenkung am Kickertisch danken. Außerdem vielen Dank für eine richtig schöne Dinnerrunde mit sehr leckerem Essen, einigen schönen Spieleabenden und für die tägliche Kafferunde mit witzigen Gesprächen auch abseits der Arbeitsthematik. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Andi und Hoang für zwei unvergessliche Israel-Reisen. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit euch unterwegs zu sein. Dem Team der 3. Semester-Betreuung danke ich für die gute und sehr unkomplizierte Zusammenarbeit. Ich danke auch meinen Wahlpflichtstudierenden Kai, Oliver, Tatjana, Klaus, Irina und Freya für die gute Mitarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Korrekturlesern.

Ein sehr großes Dankeschön geht an meine Eltern und Geschwister, die mich zu jeder Zeit unterstützt und motiviert haben. Der größte Dank geht an meine Frau, die mich mit ihrer Liebe und Zuneigung in guten aber vor allem auch in schwierigen Zeiten immer bei Laune gehalten hat, die mich immer bedingungslos unterstützt und motiviert hat und einfach immer für mich da war.